

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Caracterización del mecanismo de
señalización nuclear del receptor tirosina
quinasa ErbB4 en diferenciación celular

TESIS DOCTORAL
Irene Martínez Carrasco
Madrid 2013

Memoria presentada por Irene Martínez Carrasco para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Dr. Francisco Wandosell y el Dr. Gabriel Corfas en el Departamento de Biología Molecular.

Madrid 2013.

INDICE

Índice de Tablas, Esquemas y Figuras.....	1
Abreviaturas.....	3
Resumen y Abstract.....	6
Introducción.....	7
Origen y Desarrollo del Sistema Nervioso Central de Vertebrados.....	7
Neurogénesis.....	11
Gliogénesis.....	13
Neuregulinas y Receptores ErbB: Una Vía de Señalización Clave en el Desarrollo del Cerebro.....	16
Mecanismo de activación de los RTK.....	16
Receptores ErbB.....	17
Neuregulinas.....	19
NRG1.....	20
Patrón de expresión y papel biológico de la vía NRG1-ErbB.....	22
Receptor ErbB4: primer caso de señalización nuclear mediante un receptor tirosina quinasa.....	23
Objetivos.....	25
Materiales y Métodos.....	26
Líneas celulares y transfección.....	26
Plásmidos.....	26
Co-inmunoprecipitación y <i>Western Blot</i>	26
Cultivos primarios de precursores neuronales.....	27
Inmunofluorescencia.....	27
Ensayos de actividad luciferasa.....	28
Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.....	29
Análisis estadístico.....	30
Anticuerpos.....	30
Oligonucleótidos.....	31

Resultados.....	32
Puesta a punto de cultivos de Precursores Neuronales: Análisis del carácter multipotente.....	32
Dinámica intracelular del receptor ErbB4 tras estimulación con NRG1 en NPs.....	34
Identificación de los componentes proteicos asociados a E4ICD.....	35
Kif23 inmuno-precipita con E4ICD.....	40
Asociación de Kif23 al E4ICD en NPs.....	42
Caracterización de la expresión de Kif 23. Co-expresión de Kif23 y β III-Tubulina en cultivos neuronales y en secciones corticales	43
PARP1 inmuno-precipita con E4ICD.....	45
Asociación de PARP1 al E4ICD en NPs.....	46
PARP1 se asocia al promotor de <i>GFAP</i> tras estimulación con NRG1.....	47
PARP1 es necesario para la actividad represora de E4ICD sobre <i>GFAP</i>	48
La represión de la transcripción mediada por NRG1-ErbB4 se realiza a través del sitio de unión de CSL en el promotor de <i>GFAP</i>	50
Discusión.....	54
Conclusiones.....	62
Referencias.....	63

INDICE DE TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS

Tablas.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios empleados en este trabajo.

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Esquemas de Introducción.

Esquema 1. Localización espacial y migración de neuronas de proyección (migración radial) y de interneuronas (migración tangencial).

Esquema 2. Neurogénesis y migración durante el desarrollo de la corteza.

Esquema 3. Vía de señalización de Notch.

Esquema 4. Resumen de las vías moleculares que regulan el comienzo, progresión y final de la neurogénesis en la corteza cerebral del ratón dando así paso a la Astrogénesis.

Esquema 5. Receptores ErbB, ligandos, dímeros y vías de señalización corriente abajo.

Esquema 6. Isoformas de las NRG1.

Esquema 7. Estructura de las NRG1 tipo I-III.

Esquemas de Materiales y Métodos.

Esquema 1. Esquema de inmunoprecipitación de cromatina.

Figuras de Resultados.

Figura 1. Multipotencia de los NPs.

Figura 2. Dinámica intracelular del receptor ErbB4 en NPs inducidos con NRG1.

Figura 3. Inmunoprecipitación mediante distintos anticuerpos (ErbB4 de conejo, ErbB4 de cabra y LexA de conejo) de células 293T transfectadas con la proteína de fusión LexA-E4ICD wt.

Figura 4. Separación de las proteínas en gel de agarosa.

Figura 5. Caracterización de proteínas asociadas a ErbB4 mediante espectroscopía de masas.

Figura 6. Asociación de Kif23 al E4ICD en células 293.

Figura 7. Asociación de Kif23 al E4ICD.

Figura 8. Asociación de Kif23 al E4ICD.

Figura 9. Asociación de Kif23 a ErbB4.

Figura 10. Co-Expresión de Kif23 y de β III-Tubulina en la corteza de embriones de raton de 13 días.

Figura 11. Immuno-citoquímica de cultivos de corteza neuronal de embriones E17.

Figura 12. Asociación de PARP1 al E4ICD.

Figura 13. Asociación de PARP1 al E4ICD.

Figura 14. Asociación de PARP1 al E4ICD en NPs.

Figura 15. Asociación de ErbB4 y PARP1 a la secuencia promotora de *GFAP*.

Figura 16. El inhibidor de PARP1, 3-ABA, bloquea la represión ejercida por NRG1 en la activación del promotor *GFAP* inducida por CNTF.

Figura 17. Representación del promotor de *GFAP* (wt) y (mut).

Figura 18. La mutación en el sitio CSL del promotor de *GFAP* (*GFAP* mut) disminuye la represión ejercida por NRG1.

Figura 19. Asociación de ErbB4 y CBF1 a la secuencia promotora de *GFAP*.

Esquemas de Discusión.

Esquema 1. Vías de señalización dependientes de Presenilina.

ABREVIATURAS

3-ABA: 3-Aminobenzamida

AD: Alzheimer

AR: Anfiregulina

ARIA: Inductor de la actividad del receptor de la acetilcolina

bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico

BLBP: Proteína de unión a lípidos del cerebro

BMP: Proteína morfogenética del hueso

BPs: Progenitores Basales

BSA: Albúmina de suero bovino

BTC: Betacelulinas

Cdk: Ciclina dependiente de kinasa

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

CRD: Dominio rico en cisteínas

Dll 1: Delta-like 1

ECM: Matriz extracelular

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EPR: Epiregulina

FBS: Suero fetal bovino

FGF: Factores de crecimiento de fibroblastos

GFAP: Proteína fibrilar ácida glial

GGF: Factor de crecimiento glial

GLAST: Transportador de Aspartato-Glutamato

HEK: Human embryonic kidney

ICD: Dominio intracelular

IGF-1: Factor de crecimiento del tipo insulina-1

IgG: Inmunoglobulina

IP: Inmunoprecipitación

KD: Kilodalton

kd: *kinase dead*, mutante en el dominio quinasa

LGE: Eminencia ganglionar lateral

MGE: Eminencia ganglionar medial

NaCl: Cloruro sódico

NDF: Factor de diferenciación neuronal

NICD: Dominio Intracelular de Notch.

NPs: Neuroprecursores

NRG: Neuregulina

Ngn: Neurogenina

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Placa Cortical

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

P-Y: Fosfotirosina

RTK: Receptor tirosina quinasa

RG: Glía Radial

SNC: Sistema Nervioso Central

SH2: Región homóloga a Src

TGFa: Factor de crecimiento transformante alfa

TK : Timidina quinasa

TM: Dominio transmembrana

ZSV: Zona sub-ventricular

ZV: Zona ventricular

Wt: *Wild type*, silvestre

RESUMEN

Los precursores neurales (NPs) o células madre neurales, son células indiferenciadas de las que derivan los distintos linajes neuronales. En el presente proyecto hemos investigado la vía de señalización nuclear NRG1/ErbB4 en estas células multipotentes. Nuestros datos indican que este receptor señala a través de su dominio intracelular (E4ICD). Además describimos por primera vez que PARP1, una proteína nuclear encargada de la reparación del ADN, es parte implicada en esta señalización mediante la formación de un complejo con ErbB4. Esta interacción E4ICD-PARP1 sucede a nivel nuclear y resulta determinante en la represión transcripcional que provoca ErbB4 en genes gliales. Asimismo hemos caracterizado la unión del E4ICD con otra proteína: Kif23 y hemos estudiado su expresión en cultivos neuronales y en la corteza de ratones.

ABSTRACT

Neural precursors (NPs) or “*neural stem cells*” are undifferentiated brain cells which generate glia and neurons. In this project we have investigated the NRG1/ErbB4 nuclear signaling pathway in these multipotent cells. Our data indicate that this receptor transmits the signal through its intracellular domain (E4ICD). In addition we report for the first time, that PARP1, a nuclear protein responsible for DNA repair, is a key factor involved in this signaling by forming a complex with ErbB4. This E4ICD-PARP1 interaction occurs at the nuclear level and it is fundamental in the ErbB4-mediated transcriptional repression of glial genes. We have also characterized the binding of another protein: Kif23 and studied their expression in neuronal cultures and cortex of mice.

INTRODUCCION

Origen y Desarrollo del Sistema Nervioso Central de Vertebrados.

La característica que mejor define el Sistema Nervioso Central (SNC), es su compleja organización jerárquica (4). Esta elaboración, estructural y funcional, posibilita la existencia y el mantenimiento de acciones como integración, procesado, almacenamiento de la información y ejecución de diferentes respuestas biológicas. El SNC está compuesto fundamentalmente por dos grandes tipos celulares: neuronas y glía, cuya diversificación y especialización define gran parte de la complejidad estructural del SNC (48, 109). Por ejemplo, los diferentes tipos neuronales se pueden clasificar en base a su morfología, contenido de neurotransmisores, expresión de proteínas funcionales, tipos de sinapsis y comportamiento de disparo (65, 71). Las células gliales, a su vez, se subdividen en diferentes tipos con distintas funciones: glía radial, astrocitos (el tipo celular más abundante en el cerebro de mamíferos), oligodendrocitos, ependimocitos y microglía (4).

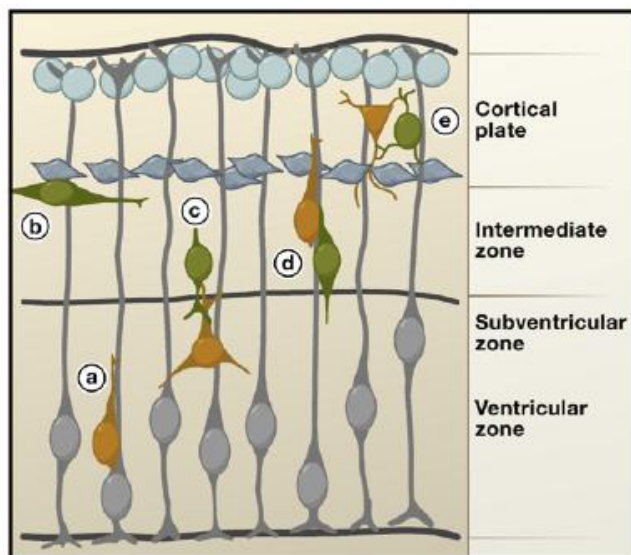
Durante el desarrollo, la primera evidencia del SNC es la placa neural. Este primordio, se origina en vertebrados a partir del ectodermo del embrión. Está formada por una única capa de células neuroepiteliales que se someten a una rápida división simétrica mediante la cual se generan dos células hijas con un mismo destino celular (12). De este modo, se genera la glía radial (RG) o células madre neurales. La RG da lugar a la mayor parte de las neuronas del SNC así como a los dos tipos principales de células macrogliales: astrocitos y oligodendrocitos (50). Este mecanismo da lugar a la expansión de la placa y a la generación del tubo neural. Después de la transición a RG, algunas células progenitoras comienzan a dividirse asimétricamente generando más RG y células que migran fuera del dominio apical de los progenitores y comienzan la diferenciación neuronal; primero la formación de las neuronas y más tarde los astrocitos y oligodendrocitos. Las células madre RG persisten como el tipo de progenitor principal durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso central y postnatal.

Concretamente en ratón, el nacimiento de las primeras neuronas del SNC se inicia en los días de gestación, entre el día 9 y 10 (E9-E10) del desarrollo embrionario; anunciando una

transición importante en el desarrollo de las células progenitoras neurales del cerebro. Coincidiendo con la adquisición del potencial neurogénico, los progenitores adquieren la identidad de RG y comienzan a expresar marcadores gliales tales como GLAST (transportador de glutamato-aspartato) y BLBP (proteína de unión a lípidos del cerebro).

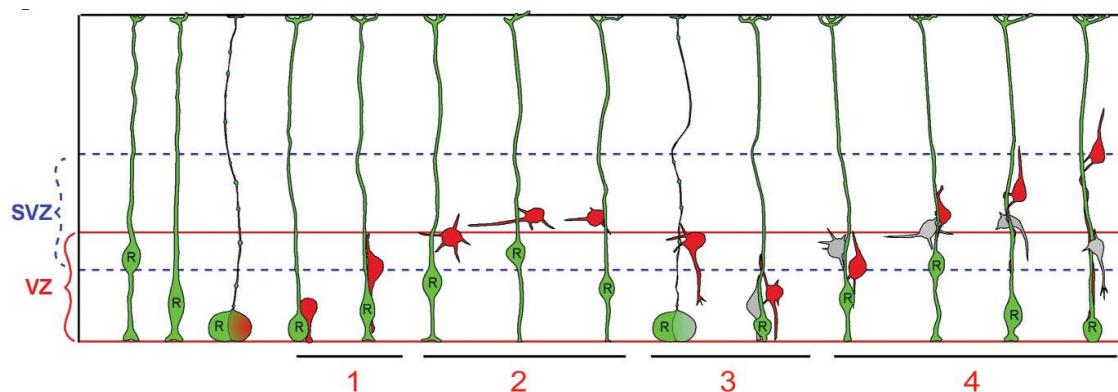
En el prosencéfalo, los linajes celulares que producen las neuronas son más complejos, con la aparición un nuevo tipo de células entre células madre y células post-mitóticas. Estas células intermedias se llaman progenitores basales o adven-ventriculares (BPS). Se generan en el telencéfalo en desarrollo por división asimétrica de las células madre de la RG (36, 70, 79).

En el telencéfalo dorsal, que da lugar a la corteza cerebral se generaran dos grandes clases de neuronas, las neuronas piramidales o de proyección (excitatorias) y las interneuronas o neuronas de circuito local (inhibitorias) (Esquema 1) (85). La corteza se desarrolla a través de una serie de procesos histogénicos que comienzan con la producción de neuronas de proyección en el epitelio pseudoestratificado que tapiza el margen de los ventrículos laterales (23, 106). En el ratón, las neuronas de proyección nacen en el epitelio ventricular o zona ventricular (ZV)/ subventricular (ZSV), entre los días E11 y E17 del desarrollo embrionario (107). Al inicio de la neurogénesis, las células progenitoras (RG en su mayoría) se dividen simétricamente dando lugar a dos células hijas. A medida que el desarrollo cortical continúa, los progenitores empiezan a dividirse asimétricamente, produciendo una neurona y una célula progenitora por cada ciclo de división (12). Así, la diferenciación celular a neuronas es inversamente proporcional a la abundancia relativa de los progenitores y de este modo, hacia el final de la corticogénesis, la mayoría de los progenitores neurales se han diferenciado en neuronas (5). Tras una última división final asimétrica, la RG neurogénica se desplaza hacia la corteza y se transforma en astrocitos (79).



Esquema 1. Localización espacial y migración de neuronas de proyección (migración radial) y de interneuronas (migración tangencial). Migración radial desde la zona ventricular a la zona subventricular de neuronas de proyección (a). Migración tangencial hacia la zona subventricular de interneuronas (b) donde contactan con neuronas de proyección multipolares (c). Migración radial de ambas células (d). Localización final en la corteza donde comparten la misma posición lamina dentro de la corteza (e). (5).

El desarrollo cortical progresa con sucesivos frentes de migración que posiciona a las neuronas dentro de las diferentes capas de la placa cortical (PC), de dentro hacia fuera, entre el momento en el que nacen y la lámina de la corteza en la que se establecen (1). De este modo, las primeras generaciones neuronales forman las capas profundas (V-VI) mientras que las últimas se localizan en las capas periféricas (II-III) (63). En contra a este sistema de organización, la capa I está constituida por astrocitos (células que se diferencian algo más tarde en el desarrollo) y por las células de Cajal-Retzius que sintetizan y secretan altas cantidades de reelina, una proteína de la matriz extracelular (ECM) que guía el patrón de estratificación cortical (35). Sin embargo, muy pocas neuronas migran directamente hacia la PC después de las fases sucesivas de migración neurogénica (Esquema 2).



Esquema 2. Neurogénesis y migración durante el desarrollo de la corteza. Esquema mostrando algunas de las capas embrionarias corticales transitorias donde tienen lugar las divisiones neurogénicas asimétricas y las fases de la migración neuronal. La RG neurogénica (verde, R) se divide asimétricamente para renovar su población y generar neuronas (células rojas, primera generación y células grises, segunda generación) en la zona ventricular (ZV). Las divisiones neurogénicas terminales ocurren en la zona subventricular (ZSV). Además, se muestran las 4 fases de migración neuronal: (1) migración radial inicial, (2) detención en la ZSV, (3) migración retrógrada y (4) migración radial secundaria (79).

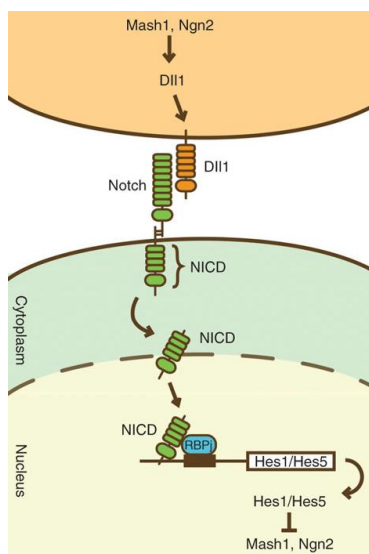
Se han identificado dos clases de migración en el prosencefalo en función de su orientación: migración radial, en la que las células migran desde la zona progenitora hacia la superficie cerebral siguiendo la disposición radial del tubo neural y una migración tangencial, en la cual las células migran de manera ortogonal a la dirección de la migración radial (63).

La migración radial se utiliza para la construcción de las estructuras laminadas del SNC tales como la corteza cerebral y el cerebelo así como la médula espinal, el estriado y el tálamo. Alrededor de un 80%-90% de todas las neuronas corticales surgen de las zonas proliferativas del telencéfalo dorsal y migran radialmente para ocupar su lugar en la corteza. Durante la formación del embrión, mientras que se ensancha la pared cortical, un sistema de fibras de glia radial aparece a lo largo del plano radial. Cada célula de la glia radial tiene su cuerpo celular (soma) en la zona ventricular y elabora prolongaciones que se expanden más allá de la pared del tubo neural y alcanza la superficie pial, donde se enganchan a la membrana basal.

Aunque la migración de tipo radial es utilizada por la mayor parte de las neuronas corticales, existe una subpoblación de neuronas que se mueve de manera tangencial al plano del sistema de fibras gliales. Entre estas células encontramos a la mayoría de las interneuronas GABAérgicas y a algunos oligodendrocitos corticales. Las dos grandes rutas identificadas van desde la eminencia ganglionar medial (MGE) hasta la neocorteza y el hipocampo y la otra va desde la eminencia ganglionar lateral (LGE) hasta el bulbo olfatorio (50, 63). Esta migración persiste en el adulto como la corriente migratoria rostral.

Neurogénesis

El comienzo de la neurogénesis y la transición a RG coincide con el comienzo de la señalización mediada por Notch en el telencéfalo dorsal (Esquema 3; (64)). No se conoce con exactitud que es lo que inicia la señalización mediada por Notch en la corteza, aunque la inducción de su principal ligando Delta-like 1 (Dll1) coincide con la aparición de proteínas proneurales como Neurogenina 2 (Ngn2) y Ascl1, que son los principales reguladores transcripcionales que gobiernan la neurogénesis a través de su regulación directa sobre Dll1 (11).



Esquema 3. Vía de señalización de Notch. Los genes proneurales Mash1 y Ngn2 inducen la expresión de los ligandos de Notch, tales como Dll1, activando la señalización mediada por

Notch en las células vecinas. Tras la activación, el NICD es desprendido de la región transmembrana y transloca al núcleo, donde forma complejo con RBPj e induce la expresión de Hes1 y Hes5 que a su vez reprimen la expresión de genes proneurales. (45).

La familia de receptores del Factor de crecimiento epidérmico (EGF) y sus ligandos constituyen otra vía implicadas en la neurogénesis (Esquema 4). En concreto, la Neuregulina 1 (NRG1) es expresada durante el desarrollo cortical y a través de sus receptores ErbB2 y ErbB4 establece la identidad de la RG impidiendo su diferenciación a astrocitos (93, 98). Se ha sugerido que ErbB2 es una diana potencial de la vía de Notch, con lo que podría intervenir en el desarrollo de la RG mediado por esta vía (98).

Por otro lado, la expresión constitutiva de la forma activa del receptor de factores de crecimiento de fibroblastos Fgfr2, también proporciona la adquisición temprana de la identidad de la RG (120). La señalización mediada por FGF es necesaria para atenuar la progresión de la RG hacia BPs (47). Los ligandos de FGF promueven la proliferación de progenitores corticales e inhiben la neurogénesis mediante la regulación de la duración del ciclo celular. En particular, la duración de la fase G1 del ciclo se incrementa notablemente durante el progreso de la neurogénesis en el cerebro de mamíferos. El ciclo celular es también mas largo en aquellos progenitores bajo divisiones neurogénicas. FGF2 mantienen la proliferación de los progenitores al comienzo de la neurogénesis (84) controlando la duración de sus divisiones. FGF2 induce la expresión de la ciclina D2 y reprime la expresión del inhibidor de la ciclina dependiente de kinasa (cdk) p27(kip1) acortando de este modo la fase G1 del ciclo y disminuyendo la proporción de divisiones neurogénicas (56). Otro mitógeno importante para los progenitores neuronales es el factor de crecimiento del tipo insulina-1 (IGF-1), el cual promueve la división neural de los progenitores mediante la inducción de ciclina D1 y ciclina D3 mientras que de manera simultanea reduce la expresión de inhibidores de cdk p27(kip1) y p57(kip2) (59). Una molécula relacionada, IGF-2 es secretada al fluido cortico-espinal por el plexo coroideo proporcionando una señal mitogénica para las células progenitoras corticales que recubren la cavidad ventricular.

Otro regulador importante de la producción neuronal en la corteza en desarrollo es Wnt, implicado en promover la proliferación y el mantenimiento de los progenitores (15, 58, 118, 122). Los efectos de Wnt en el desarrollo de la corteza son complejos y múltiples. Wnt se ha relacionado con la transición de la RG a BPs mediante la regulación de N-myc y del gen proneural Ngn1 (39, 51, 115). Otros trabajos sugieren su participación en la diferenciación neuronal de los BPs (73).

Finalmente, otra vía importante es la de la proteína morfogenética del hueso (BMP) que promueve la neurogénesis al comienzo del desarrollo (54, 57) y posteriormente la bloquea promoviendo a su vez la generación de astrocitos (33, 74).

Gliogénesis

Alrededor del día E18 del desarrollo cortical del ratón ocurre otra gran transición. Los progenitores dejan de producir neuronas y aparecen los primeros astrocitos. Durante este proceso, la mayoría de los precursores pierden sus procesos radiales, abandonan su localización apical en el ventrículo y se mueven hacia arriba donde poco a poco adquieren una morfología multipolar, una morfología astrocítica.

A parte de pequeñas poblaciones de RG que mantienen y conservan la capacidad para producir neuronas en regiones definidas a lo largo de la vida (es decir, la zona subventricular de los ventrículos laterales y el giro dentado del hipocampo), muy pocas neuronas se producen en el ratón o en la corteza cerebral de primates más allá de la transición neurogénica a astrogénica (50). Debido a esta transición relativamente brusca, el fin de la neurogénesis es cuidadosamente controlado para asegurar que todas las neuronas necesarias para la función del cerebro adulto nazcan antes de que comience la gliogénesis.

La señal astrocítica más importante es la perteneciente a la vía Jak/Stat. La señalización Jak/Stat es necesaria para la identidad de la RG aunque está activa en niveles relativamente bajos durante la neurogénesis (46).

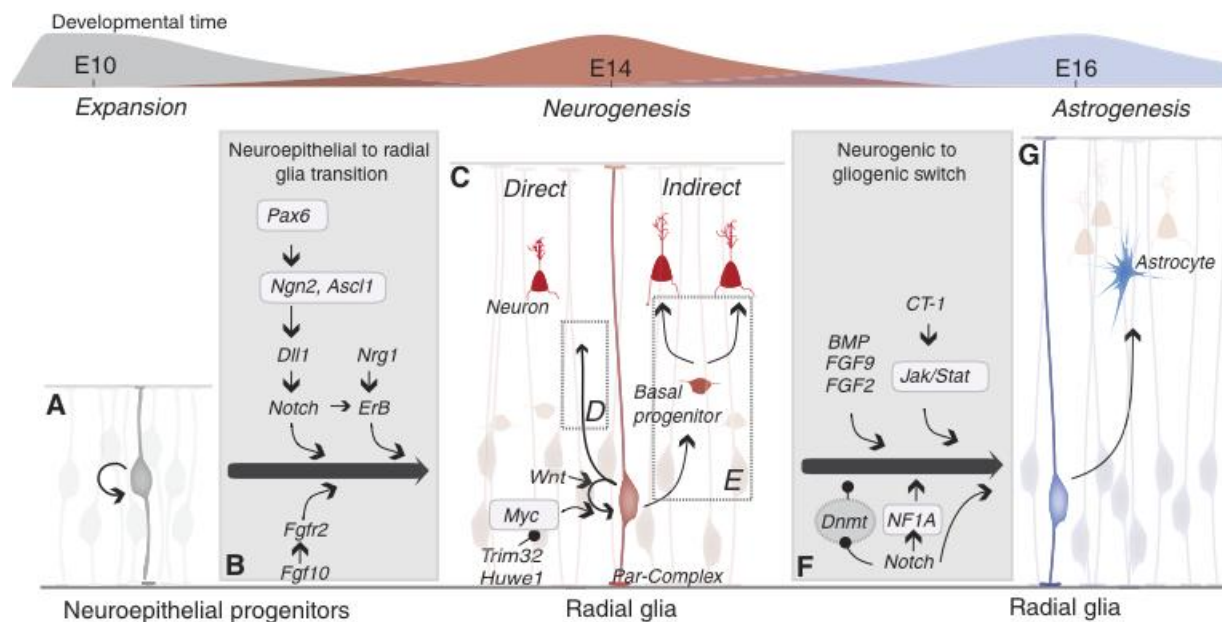
Mientras que la actividad de la vía Jak/Stat aumenta durante la transición neurogénesis-gliogénesis (37), la señalización mediada por Notch experimenta un cambio dramático. Al principio de la corticogénesis, Notch promueve el estado progenitor de la RG, pero más tarde, la activación de Notch estimula la diferenciación de astrocitos y bloquea la diferenciación neuronal tanto *in vitro* como *in vivo* (13, 32). Ge y colaboradores demostraron que el dominio intracelular de Notch (NICD) y los factores de transcripción de RBPj (también conocidos como CSL o CBF1) forman un complejo de activación de la transcripción en el promotor de *GFAP* (37). *In vitro* observaron como en los cultivos de precursores neuronales (NPs) mutantes para RBPj, la aparición de astrocitos se retrasaba.

Por su parte, Namihira y colaboradores demostraron que la principal fuente de señalización de Notch durante la corticogénesis se da en neuronas jóvenes y BPS que expresan el ligando de Notch Dll1 (76). La señalización mediada por Notch en células progenitoras corticales activa directamente el Factor Nuclear IA (NFIA), un factor de transcripción que promueve la gliogénesis de la médula espinal (17, 76). Las acciones combinadas de Notch y NFIA causan la desmetilación del promotor de *GFAP* (y presumiblemente de otros genes astrocíticos) a través del desplazamiento de las enzimas ADN metiltransferasas, lo que hace que sea sensible a una activación adicional mediada por Jak/Stat y Notch (76). Las proteínas Hes, que son las principales dianas de actuación de Notch / RBPj en el SNC en desarrollo, interactúan físicamente con los factores Jak y Stat incrementando su actividad (46). Por tanto, las vías de Notch y de Jak/Stat convergen para proporcionar una señal astrogial fuerte.

Al igual que Notch, la vía BMP también tiene diferentes efectos sobre la corticogénesis temprana y tardía. Al comienzo de la señalización BMP promueve la neurogénesis, mientras que al final de la expresión estimula el desarrollo astrogial. Al igual que hay una cooperación entre Notch y la vía Jak/Stat, existe también una sinergia pro-astrocítica entre BMP y LIF (otro activador de la vía de señalización Jak/Stat) mediada por la formación de un complejo entre Stat3, Smad1, y el coactivador p300, que juntos activan de una manera muy eficaz el promotor de *GFAP* (75). Otro efecto importante de la señalización de BMP en el desarrollo cortical tardío es la inducción de los factores negativos “hélice-bucle-hélice” de la familia Id, que inhiben los factores de transcripción pro-neuronales Ngn1/2 y Ascl1 (74).

Otra vía de señalización que promueve la diferenciación glial tardía en el desarrollo, es la vía de FGF. *In vitro*, FGF2 es necesario para la activación de genes astrogliales mediada por Jak/Stat (101), importante en la codependencia de múltiples vías de señalización en la transición de neurogénesis a gliogénesis. *In vivo*, el ligando FGF más importante en este contexto es FGF9, inducido por el factor de transcripción Sip1 en las neuronas de la placa cortical y que a su vez señala retrogradamente a los progenitores de la zona ventricular para promover la diferenciación glial e inhibir la neurogénesis (99). Por lo tanto, cuando la tasa de neurogénesis alcanza su punto máximo, los niveles de CT-1, FGF9, BMP y ligandos de Notch de neuronas y precursores neuronales son amplificados. Este efecto cuantitativo, junto con la colaboración entre las vías, provoca en última instancia el cese repentino de la neurogénesis y el comienzo de la gliogénesis.

De este modo, es la producción de neuronas lo que proporciona el mecanismo temporal necesario para indicar el final de la neurogénesis y pautar el comienzo de la gliogénesis.



Esquema 4. Resumen de las vías moleculares que regulan el comienzo, progresión y final de la neurogénesis en la corteza cerebral del ratón dando así paso a la Astrogénesis. El

comienzo de la neurogénesis está asociado con la transformación de las células neuroepiteliales (A) en RG (C). Varias vías de señalización, incluyendo Dll1/Notch, Nrg1/ErB, and Fgf10/ Fgfr2 realizan dicha transformación. La RG genera neuronas de manera directa (D) o mediante progenitores basales (E). El fin de la neurogénesis inicia la diferenciación de la RG hacia astrocitos (G). Varias vías de señalización actúan de manera conjunta para promover dicho cambio. (Jack/Stat, Notch, BMP, FGF) (64).

Neuregulinas y Receptores ErbB: Una Vía de Señalización Clave en el Desarrollo del Cerebro

Como hemos mencionado anteriormente uno de las vías de señalización mas importantes que controlan la división *Stem* es mediada por miembros de la familia denominados ErbB o EGFR . Estos receptores poseen actividad tirosina quinasa (RTKs) es decir, poseen la capacidad de catalizar la transferencia de grupos fosfato γ de la molécula de ATP a aquellas tirosinas presentes tanto en los propios receptores (autofosforilación) como en determinadas proteínas susceptibles de ser fosforiladas por estos (transfosforilación) (41, 42). Estos receptores desempeñan un papel crucial en el control de procesos celulares básicos como proliferación, migración, metabolismo, diferenciación y supervivencia celular, así como en la regulación de la comunicación intercelular durante el proceso del desarrollo. Su estructura es análoga a todos los miembros de la superfamilia de RTK's y en ellos se puede definir una serie de dominios: i) un dominio extracelular de unión al ligando que generalmente se encuentra glicosilado; ii) un dominio transmembrana y, iii) un dominio intracelular o citoplasmático que contiene un dominio tirosina quinasa, así como otras secuencias reguladoras que pueden ser susceptibles de auto o transfosforilación (95, 97).

-Mecanismo de activación de los RTK

Una característica de los RTKs es que el ligando genera un cambio conformacional en el receptor que promueve su dimerización (97, 110). Esto permite que los extremos citosólicos de ambos receptores disparen el proceso de señalización intracelular. La autofosforilación del dominio citoplasmático de los RTKs es crucial en el mecanismo de activación de las diferentes

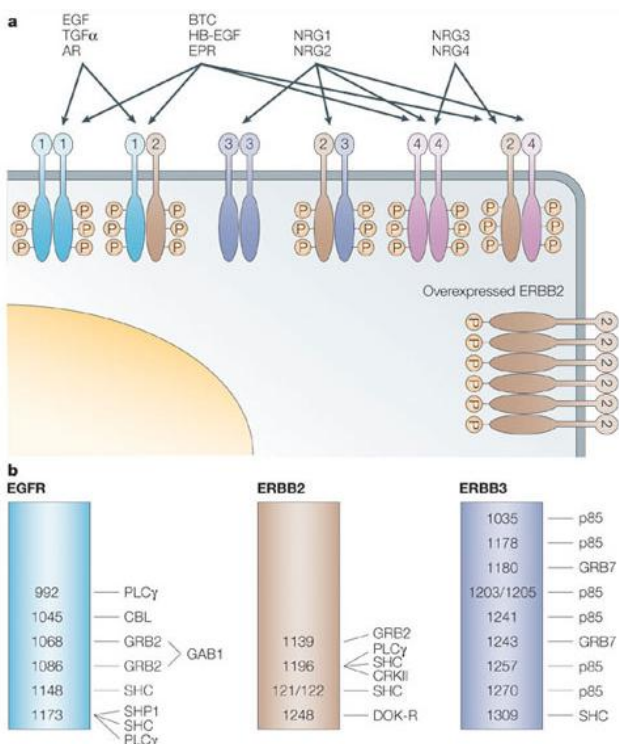
proteínas implicadas en la cascada de señalización dependiente de la activación de ese receptor específico (96). La fosforilación puede producirse no sólo en aquellas tirosinas situadas en el propio dominio quinasa del receptor, lo que incrementará la actividad tirosina quinasa intrínseca de la enzima, sino también en otras tirosinas intracelulares pero fuera del dominio quinasa. Estas últimas contribuyen a la conformación de lugares de unión de alta afinidad para multitud de proteínas, proteínas que posteriormente participarán en el proceso de señalización hacia el interior de la célula. Una vez que la proteína se une a una determinada fosfotirosina localizada en la porción citosólica del receptor, ésta puede ser a su vez fosforilada en una de sus tirosinas por el dominio quinasa del receptor y con ello ser activada. Las proteínas participantes en las cascadas de señalización intracelular suelen compartir determinados dominios muy conservados de unión a fosfotirosinas. Entre ellos, los más comunes son los dominios PTB (phosphotyrosine-binding) y los dominios SH2 (*Src homology region*) (38, 49, 62). Éstos dominios, permiten a las proteínas de las que forman parte, tanto la unión al RTK activado como a otras proteínas intracelulares que hayan sido a su vez fosforiladas en algún residuo tirosina. Otros tipos de dominios son los SH3 que permiten a la proteína la posibilidad de interaccionar con dominios ricos en residuos prolina presentes en otras proteínas.

Una vez activados, estos receptores inducirán múltiples vías de señalización que a su vez resultarán en la expresión de genes implicados en el control de aquellos procesos celulares básicos en los que los RTKs desempeñan un papel clave. Algunas de las vías de RTK más estudiadas son la vía de Ras-MAPK y la vía de PI3K-AKT.

-Receptores ErbB

Los genes de la familia ErbB reciben su nombre de una forma truncada del receptor del factor de crecimiento epitelial humano (EGFR o también nombrado ErbB1 y HER) encontrada a principios de los años 80, codificada en la secuencia del virus aviar de la eritroblastosis (v-ErbB) (18, 113). Desde entonces, se conocen cuatro miembros de la familia ErbB (ErbB 1-4) y se ha comenzado a estudiar las funciones biológicas de estos receptores y sus ligandos en las comunicaciones célula-célula. Los cuatro receptores comparten, en términos generales, una misma estructura formada por dos regiones ricas en cisteínas en su región extracelular y un

dominio quinasa seguido de una cola carboxilo terminal con dominios tirosina autofosforilables (119). (Esquema 5)



Esquema 5. Receptores ErbB, ligandos, dímeros y vías de señalización corriente abajo. Los miembros del factor de crecimiento epidérmico (EGF) son ligandos para los receptores de ErbB. La unión induce la formación de formas homo-y heterodiméricas del receptor y la activación del dominio quinasa intrínseca, lo que resulta en la fosforilación en residuos de tirosina específicos dentro de la cola citoplásmica. Estos residuos fosforilados sirven como sitios de interacción para un amplio número de proteínas cuyo reclutamiento conduce a la activación de vías de señalización intracelular. AR, anfíregulina, BTC, betacelulina, EPR, eprirregulina, HB-EGF, EGF de unión a heparina; NRGs, neuregulinas; TGF α , factor de crecimiento transformante- α . (44).

Uno de los ligandos más estudiados de los receptores ErbB son las NRGs. Aunque no todos los tipos de ErbB interactúan directamente con estos ligandos, en presencia de los correceptores adecuados, las NRGs regulan la fosforilación de los cuatro receptores ErbB

induciendo la homo o hetero dimerización de éstos. Concretamente, ErbB1 y ErbB2 no unen NRG (40), ErbB3 si lo hace pero es incapaz de ver accionada su actividad tirosina quinasa por este efector (34). Sin embargo, ErbB4 es el único capaz de unir NRG1 y desencadenar una respuesta de forma independiente al resto de los miembros de la familia (88).

Cuando los receptores ErbB se fosforilan, varias moléculas son reclutadas hacia sus residuos de tirosina fosforilados, permitiendo la activación intracelular de vías de señalización transduccionales como la vía Ras/MapK y la vía PI3K/Akt implicadas en proliferación, supervivencia celular y diferenciación (6).

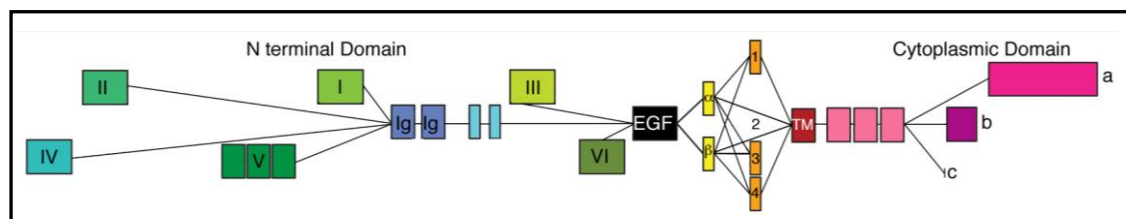
Neuregulinas

Las NRGs1-4 conforman una familia de proteínas que interaccionan con los receptores ErbB (9). El primer miembro de esta familia, NRG1, fue aislado coetáneamente en varios laboratorios que reportaron diferentes nombres y actividades biológicas tales como i) factor de diferenciación neuronal soluble (NDF, también llamado Heuregulina) encontrándose que era capaz de fosforilar residuos de tirosina del receptor ErbB2/HER2 (40, 81, 117); ii) Este mismo factor fue también descrito como inductor de la actividad del receptor acetilcolina (ARIA), molécula que aumentaba la síntesis de receptores acetilcolina a nivel de la unión neuromuscular (22); iii) igualmente, la NRG1 fue descrita como factor de crecimiento glial (GGF) como mitógeno en células de Schwann de pituitaria bovina (31, 61).

Al poco tiempo se demostró que todos estos factores eran isoformas del mismo gen. Además de la NRG1, se identificaron tres genes más que codifican para NRGs en vertebrados (NRGs2-4), sin embargo, poco es lo que se conoce actualmente de estos tres últimos tipos de NRG (21).

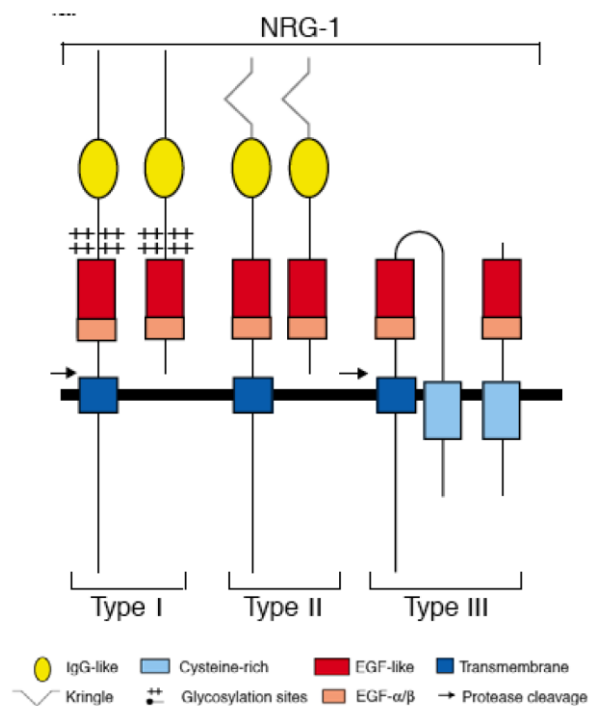
NRG1

En este trabajo centraremos la atención en NRG1. Es expresada principalmente en neuronas y en menor medida en glía así como en corazón, hígado, estómago, pulmón, riñón, bazo y piel. Su heterogeneidad de expresión se basa en la utilización de diversos promotores así como en su procesamiento o *splicing* (16). Existen seis tipos de NRG1 que pueden llegar a formar más de 15 isoformas diferentes nombradas en base a variaciones en su dominio N-terminal (tipos del I al VI) y su secuencia yuxtamembrana extracelular (α/β y 1-4) (Figura 2). Un único exón codifica para el dominio transmembrana (TM), dominio presente en la mayor parte de isoformas, seguido de varios exones que pueden producir tres tipos diferentes de dominios intracelulares (a, b y c) (Esquema 2) (103).



Esquema 6. Isoformas de las NRG1. Esquema del gen humano de NRG1 mostrando la posición relativa de los diferentes exones conocidos (la distancia entre exones no representa una escala real) (103).

Las que han sido más ampliamente caracterizadas mediante diferencias en sus dominios extracelulares son las NRGs tipo I-III (Esquema 3).



Esquema 7. Estructura de las NRG1 tipo I-III (100)

La NRG1 tipo I tiene un dominio tipo inmunoglobulina (IgG) seguido de una zona rica en glicosilación; la NRG1 tipo II tiene un dominio específico GGF (“*kringle*”) seguido de un dominio tipo IgG y la NRG1 tipo III, no tiene un dominio IgG sino un dominio rico en cisteínas (CRD). Más abajo de la región variable amino terminal las formas TM de las NRGs contienen lo siguiente: un dominio tipo EGF, con variantes de *splicing* en la región carboxilo-terminal que dan lugar a las isoformas α y β ; una región yuxtamembrana con sitios de corte de proteasas; un dominio TM y una larga cola citoplasmática. Las isoformas β de los dominios tipo EGF son mayoritarias en el sistema nervioso mientras que las isoformas α se encuentran fundamentalmente en el mesénquima (68). El dominio tipo EGF es suficiente en sí mismo para unirse a los receptores ErbB e inducir su dimerización. Hasta el momento, el criterio de clasificación de los ligandos tipo EGF no ha sido claramente definido. Sin embargo, la subfamilia de NRGs comparte una alta afinidad en dicho dominio, distinguiéndolas así de otros ligandos (9).

Patrón de expresión y papel biológico de la vía NRG1-ErbB

La NRG1 y los receptores ErbB se expresan diferencialmente en la mayor parte de áreas del cerebro (30). El sistema nervioso tiene los mayores niveles de expresión de NRG1, donde es expresada principalmente por neuronas (16). Los astrocitos, las células de Schwann y los oligodendrocitos también tienen niveles de expresión de NRG1 aunque estos son más reducidos (27, 83).

La señalización NRG1-ErbB regula interacciones celulares durante el desarrollo. Ésta vía de señalización es crítica para la comunicación entre neuronas y glía radial, astrocitos y células de Schwann. La NRG1 promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células de Schwann mielinizadas del sistema nervioso periférico (PNS), principalmente a través de los receptores ErbB2 y ErbB3 (8, 100, 112). Por su parte, en el sistema nervioso central se han descrito un amplio conjunto de papeles funcionales relacionados a la vía de señalización NRG1/ErbB, tales como la migración neuronal, guía axonal y funciones sinápticas (25, 55, 67, 90). El laboratorio del Prof Corfas (90) mostró por primera vez que esta vía de señalización regulaba la formación de la glía radial en astrocitos así como la migración neuronal en el cerebelo. Posteriormente esto fue confirmado al observar que bloqueando la señalización de ErbB se inhibía la formación de la glía radial (3, 98).

La letalidad embrionaria de los ratones mutantes de NRG1 y de ErbB ha dificultado su análisis *in vivo* en el sistema nervioso. Sin embargo, varios estudios *ex vivo* apoyan un posible papel de ambos genes en la diferenciación de oligodendrocitos y en mielinización (104, 111). Mediante el uso de ratones que sobre-expresaban el receptor dominante negativo de ErbB en oligodendrocitos, se confirmó cómo la pérdida de la vía de señalización NRG1-ErbB en dichas células provoca una alteración en la mielina (reducción del grosor y conductividad) y en el número de oligodendrocitos en el cerebro adulto. Así mismo se provocan daños en la función dopaminérgica, lo que finalmente provoca alteraciones de comportamiento que son compatibles con desordenes psiquiátricos (92). Además, se ha demostrado que mutantes en NRG1 tipo III heterocigotos están hipomielinizados (108). La identificación de NRG1 como un gen de susceptibilidad a padecer esquizofrenia en humanos (52, 102) ha renovado el interés suscitado por esta vía de señalización en el desarrollo del cerebro de mamíferos.

Receptor ErbB4: primer caso de señalización nuclear mediante un RTK

El receptor ErbB4, pese a ser el miembro más recientemente descrito de la familia de ErbBs (82) presenta una estructura y un mecanismo de acción que hacen de éste, un tipo especial de receptor tirosina quinasa. Es activado por NRGs, Betacelulinas (BTC) y por factores de crecimiento tipo EGF que unen heparina; siendo la NRG1 su principal ligando. Existen diversas isoformas generadas mediante un procesamiento o *splicing* del ARN mensajero, lo que sugiere diferencias funcionales de dicho receptor (10).

La isoforma CYT-2 carece de 16 aminoácidos en la región citoplasmática que afecta al dominio de unión de la subunidad p85 de la PI3K. La originalmente descrita, que incluye el dominio de unión de PI3K, se denomina en este caso CYT-1. Ambas isoformas unen NRG1 y son capaces de fosforilar residuos tirosina quinasa tras la estimulación por ligando. Sin embargo, mientras que la isoforma CYT-1 activa la PI3K, la isoforma de CYT-2 es incapaz de hacerlo ya que carece del dominio de unión de PI3K. La expresión de ambas isoformas es dependiente de tejido. El corazón el pecho y la aorta abdominal expresan principalmente la CYT-1 mientras que el tejido nervioso y el riñón expresan CYT-2 preferentemente (19).

La secuenciación del ErbB4 humano (HER4) reveló la existencia de otra nueva isoforma. La isoforma conocida hasta ese momento constaba de 23 aminoácidos (JM-a) en la región yuxtamembrana extracelular y la nueva isoforma, de tan sólo 13 aminoácidos, se denominó JM-b. Ambas se expresan en tejidos neurales sin embargo, en riñón sólo se expresa la isoforma JM-a y en el corazón sólo la JM-b. HER4 es fundamental en el desarrollo del corazón: ratones deficientes de HER4 mueren durante el desarrollo embrionario debido a la imposibilidad de formar la trabécula del miocardio (28). Esto sugiere que el receptor está implicado en el desarrollo y mantenimiento de una gran variedad de órganos y tipos celulares (20). Mediante ensayos de fosforilación de tirosinas se demostró que ambas isoformas eran activadas del mismo modo mediante NRG- β 1 y BTC y en menor medida por NRG α 1 y por factores de crecimiento tipo EGF que unen heparina. Sin embargo existía una diferencia funcional en respuesta a tratamientos con éster forbol resultando en una pérdida de unión a NRG- β 1 y en la reducción de

todas las proteínas celulares asociadas a transfectantes JM-a pero no a transfectantes JM-b (20). Esto reveló que la región yuxtamembrana del receptor es susceptible al corte proteolítico. Posteriormente se demostró que la metaloproteasa TACE (También conocida como ADAM 17) era la encargada de realizar el corte del ectodominio de la isoforma del receptor JM-a tras la activación por NRG1 (89). El fragmento que queda asociado a la célula, que contiene los dominios transmembrana y citoplasmático, es posteriormente cortado por la presenilina/gamma secretasa, liberando el dominio intracelular del ErbB4 (E4ICD) al citosol (77). Finalmente el E4ICD se transloca al núcleo siendo el receptor ErbB4 el primer receptor tirosina quinasa que señala directamente mediante su ICD.

El significado biológico del corte proteolítico de ErbB4 fue estudiado posteriormente en el laboratorio del Prof. Corfas. La señalización nuclear de ErbB4 inducida gracias a NRG1 y a la proteólisis mediada por TACE y presenilina regula la astrogénesis en el cerebro en desarrollo mediante la formación de un complejo compuesto por E4ICD y las proteínas Tab2 y N-CoR. Éste complejo se transloca al núcleo donde reprime la transcripción de genes gliales tales como GFAP (Proteína Fibrilar Ácida de la Glía) y S100 β (93). Aunque empezamos a entender la gran importancia biológica de esta vía de señalización nuclear en el cerebro así como la belleza mecánica de la activación de ErbB4, quedan aún muchos interrogantes algunos de los cuales son objetivos y punto de partida de este proyecto.

OBJETIVOS

Durante el desarrollo embrionario, existen diversas vías de señalización que intervienen en la determinación del destino neuronal a partir de los precursores neuronales indiferenciados (NPs). La integración de múltiples señales orquesta el encendido y apagado de estas vías posibilitando en último término que los distintos tipos celulares aparezcan en un orden secuencial apropiado.

La especificación neuronal o glial es un modelo fascinante en el que múltiples vías de señalización, factores de transcripción y mecanismos epigenéticos juegan un papel determinante en el control fino de la maquinaria de elección del destino celular. En la presente Tesis Doctoral, he explorado la vía de NRG1-ErbB4 y sus implicaciones en la diferenciación de los NPs. Uno de los principales intereses radica en que este receptor tirosina quinasa es capaz de señalizar directamente al núcleo controlando la transcripción de genes astrocíticos. Para caracterizar en detalle los mecanismos mediante los que el receptor ErbB4 realiza la señalización nuclear en NPs estimulados con NRG1, hemos propuesto como objetivos concretos de este trabajo:

1. Estudiar la multipotencia de los cultivos de NPs de telencéfalo de rata.
2. Estudiar el mecanismo molecular de activación del ErbB4 por NRG1 en NPs.
3. Analizar el complejo multiproteico asociado a E4ICD identificando con ello nuevas proteínas vinculadas a la ruta de señalización NRG1-ErbB4.
4. Estudiar el papel de PARP1 en la represión transcripcional de genes gliales por E4ICD.
5. Estudiar la expresión de Kif23 para explorar su papel en el complejo formado con el E4ICD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares y transfección

Las células HEK293T (Human Embryonic Kidney 293T) se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5% en medio DMEM-Glutamax (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos con una densidad de 2x10⁵ células por pocillo el día previo a la transfección. Para cada transfección, se incubaron separadamente durante 5 minutos a temperatura ambiente 1µg de ADN (en 0.5ml de medio Opti-MEM (Invitrogen)) y 3µg de Lipofectamina-2000 (Invitrogen 1µg/µl) preparada en 0.5ml de medio Opti-MEM. Transcurridos 5 minutos, el DNA y la Lipofectamina se mezclaron e incubaron durante 20 minutos más a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos DNA-Lipofectamina. A continuación, la mezcla de reacción se agregó a cada pocillo con células al 70% de confluencia y se incubó durante 3 horas (37°C, CO₂ al 5%). Después de este periodo se cambió el medio de transfección por medio de cultivo. Tras 24 horas, las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas.

Plásmidos

Los plásmidos usados en los ensayos de luciferasa: GFAP-luciferasa, y Timidina Quinasa (TK)-Renilla luciferasa fueron generosamente cedidos por el Dr. Michael Greenberg (Harvard Medical School). La proteína de fusión LexA-E4ICD (wt) fue generada mediante el clonaje del fragmento de ADN que codifica el dominio intracelular del ErbB4 (E4ICD, residuos aminoacídicos 676-1308) en el vector pcDNA3. Para la creación del derivado mutante LexA-E4ICD kd (*kinase-dead*) se eliminó el dominio de unión de ATP mediante mutagénesis dirigida.

Co-inmunoprecipitación y *Western Blot*

Las células fueron lavadas con PBS frío en hielo y lisadas en tampón de lisis (Tris 20mM pH 7.4, NaCl 150mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X-100 al 1%, pirofosfato sódico 2.5

mM, ortovanadato sódico 1mM y un preparado comercial de inhibidores de proteasas (Roche). Para la inmunoprecipitación, los lisados fueron preincubados con agarosa durante 30 minutos eliminando así interacciones inespecíficas. Tras este paso, el sobrenadante es inmunoprecipitado durante toda la noche a 4° C con un antisuero comercial conjugado a agarosa (Santa Cruz) que reconoce específicamente la proteína ErbB4. El inmuno-precipitado fue lavado cuatro veces con el tampón de lisis antes de ser resuspendido en tampón de carga y hervido durante dos minutos a 95° C. Las muestras fueron separadas electroforéticamente en condiciones desnaturizantes (gel SDS-PAGE al 7.5%) y transferidas finalmente a una membrana de PVDF (Millipore). Las membranas fueron incubadas durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente para cada ensayo, preparado en leche al 3% en PBS. A continuación, se empleó un antisuero secundario apropiado conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch) y se reveló mediante quimioluminiscencia (Western Lightning chemiluminescence reagent, Perkin Elmer Life Sciences). En aquellos casos en los que las muestras correspondan a fracciones citoplasmáticas de los NPs, la preparación fue realizada tal y como describe en (114).

Cultivos primarios de precursores neuronales

Ratas *Long-Evans* preñadas (Charles River Laboratories) fueron tratadas según las directrices de comité de uso y cuidado animal del Children's Hospital Boston. Los NPs fueron aislados como se describe en (7) a partir de telencéfalos de rata de 14 días (E14) y cultivados durante 5 días en medio DMEM-F12 GLUTAMAX (GIBCO) con FBS al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. El medio se complementó con bFGF (Peprotech) y N2 (GIBCO). Cuando fuese necesario, las células fueron tratadas con: Neuregulina1-β1 recombinante humana 1nM (R & D Systems,); CNTF 0.3ng/ml (Millipore); 3-Aminobenzamida 0.1ng/ml (3-ABA, Sigma); PDGF 10ng/ml (Peprotech,) o en su defecto, se empleó una solución de BSA al 0.1% (Sigma) en PBS como control.

Inmunofluorescencia

Las células fueron crecidas sobre vidrios y fijadas con 4% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos, permeabilizadas en de Triton X-100 al 0.1% en PBS durante otros 10

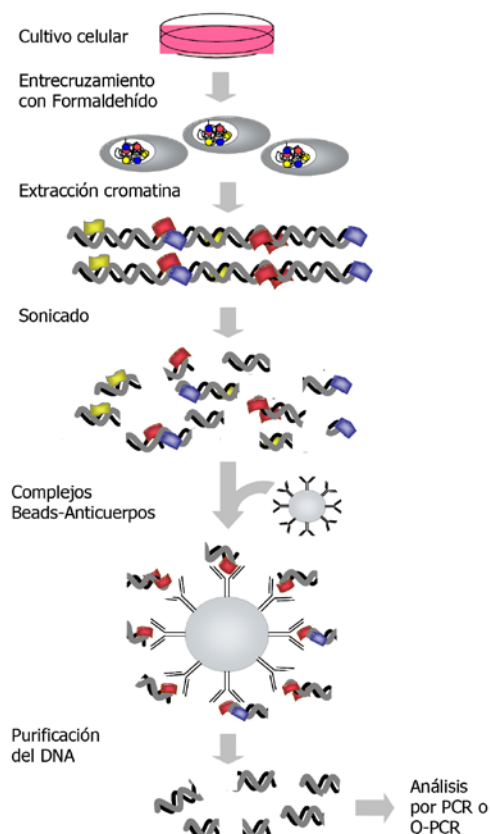
minutos e incubadas con la solución de bloqueo (BSA al 5% en PBS) durante 30 minutos. Las células se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante la noche a 4°C. Los vidrios fueron lavados con PBS y la detección fue realizada mediante fluorescencia tras incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado para cada caso (Jackson Immuno Research). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342 1nM (Invitrogen). Los vidrios fueron lavados tres veces durante 10 minutos y montados con Vectashield (Vector Laboratories). Las imágenes fueron tomadas en un microscopio Nikon (Eclipse E800) usando Spot advanced image software (versión 3.4.4).

Ensayos de actividad luciferasa

Para los ensayos de actividad luciferasa los NPs se sembraron con una densidad de 1×10^5 células/pocillo en placas p24 y fueron cultivadas durante un total de 5 días antes de ser transfectadas. 24h antes de la transfección se sustituye el medio de cultivo por medio fresco. Las células en cada pocillo se co-transfectaron, como se indica anteriormente, añadiendo un volumen final de mezcla de transfección de 0.1ml y conteniendo: 0.6 µg de plásmido GFAP-Luciferasa (luciferasa de luciérnaga expresada bajo el promotor de GFAP) y 0.2 µg de plásmido TK-Renilla (Renilla luciferasa expresada bajo el promotor de la timidina quinasa). Tras 24 horas de incubación, se retiró el medio y las células fueron lisadas durante 15 minutos en agitación con un tampón comercial de lisis (Passive Lysis Buffer, Promega). A continuación, en una placa de 96 pocillos, se mezclaron 40 µL de extracto celular con 40 µl del sustrato de la luciferasa (LAR II, Luciferasa Assay Reagent de Promega) y se procedió a medir la actividad luciferasa. Finalmente, se agregaron 40 µl de Stop & Glo® Reagent (Promega) que detiene la reacción de la luciferasa y contiene el sustrato para la Renilla luciferasa, tomándose una nueva medida de la actividad luciferasa. Las actividades se midieron en un luminómetro Wallac 1420 VICTOR utilizando el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) y siguiendo las instrucciones del manual técnico. Los valores obtenidos se expresan como actividad luciferasa relativa: Luciferasa/Renilla.

Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina

La técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se usa para la identificación de interacciones *in vivo* entre factores transcripcionales y sus lugares específicos de unión en la cromatina mediante inmunoprecipitación de los complejos DNA-proteína y la posterior caracterización de las secuencias asociadas al factor de interés (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema de inmunoprecipitación de cromatina.

Los NPs fueron tratados con NRG1 o en su defecto con BSA al 0.1% durante 6h en condiciones de cultivo. A continuación, fueron fijados con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos a 37°C en suave agitación. Posteriormente se procedió al lisado y sonicación de las muestras hasta conseguir un tamaño medio de fragmentos de ADN entre los 200 y los 1500 pb (Sonicador S4000, Misonix). La cromatina sonicada se incubó con los antisueros correspondientes contra ErbB4 y PARP1, así como con IgG de conejo como anticuerpo no reactivo. Una alícuota de la cromatina sin inmunoprecipitar se utilizó como indicador del

material de partida (*input*). El ensayo se llevó a cabo con el Kit comercial de Upstate de acuerdo con las recomendaciones del distribuidor. Tras la elución, las muestras fueron tratadas con 1 μ l de RNasa A 10 μ g/ml (Sigma) durante una hora a 37°C y con proteinasa K 25 μ g/ml (Roche) durante dos horas a 37°C. Tras purificar el DNA de cada una de las muestras (QIAquick PCR purification kit, Qiagen) se caracterizó la naturaleza de los fragmentos de ADN presentes en el eluido mediante PCR semicuantitativa con oligonucleótidos específicos (Tabla 2).

Análisis estadístico

En los ensayos de diferenciación celular de los NPs, más de 300 células por condición fueron clasificadas como neuronas y astrocitos en un total de tres experimentos independientes. La cuantificación de la transcripción de *GFAP* fue analizada estadísticamente mediante *t* de Student con el software SPSS 14.0.

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios empleados en este trabajo.

Anticuerpo	Compañía
ErbB4	Santa Cruz
ErbB4-agarosa	Santa Cruz
PARP1	Cell Signaling
N-CoR	Upstate-Millipore
TAB2	Santa Cruz
4G10	Upstate-Millipore
Nestin	Chemicon-Millipore
GFAP	Chemicon-Millipore
β III-Tubulina	Ab Cam
GADPH	Santa Cruz
IgG	Santa Cruz
Kif23	Santa Cruz
CBF1	Cell Signaling

Tabla 2. Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Gen	Zona	Oligonucleótido
GFAP	Promotor	Directo GACTAAGCTGTTTCCTCGGC
		Reverso CAAGGTCACGTGTACCCAGAG

RESULTADOS

Puesta a punto de cultivos Precursores Neuronales: Análisis del carácter multipotente.

Los NPs son aislados de cerebros de embriones y pueden ser mantenidos en cultivo en su forma indiferenciada o bien ser inducidos a adoptar un destino neuronal o astrocítico. Dicha diferenciación celular se estimula *in vitro* mediante la adición exógena de moléculas señalizadoras extracelulares tales como el Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF) que promueve la diferenciación celular a astrocitos o el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) que induce el destino neuronal.

Para comprobar su carácter multipotente, los NPs aislados de telencéfalo de rata procedentes de embriones de 14 días (E14) fueron sometidos a tratamiento con CNTF por un periodo de 5 días según se detalla en (7). A continuación se cuantificó el porcentaje de astrocitos frente al número total de células. Esta distinción se realizó mediante ensayos de inmunocitoquímica empleando un antisuero específico contra la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) como marcador de astrocitos.

En cultivos paralelos, las células fueron tratadas con PDGF durante el mismo periodo e igualmente se cuantificó el número de precursores que habían diferenciado a neuronas frente a la población total celular mediante tinción inmuno-citoquímica. Dicha cuantificación se realizó en base a la detección específica de neuronas con un antisuero purificado contra la isoforma β III de la proteína β -tubulina (Figura 1).

Como control del número total, para ambos ensayos, e independientemente del estado de diferenciación, todos los tipos celulares se tiñeron con el marcador nuclear Hoechst 33342 para calcular la abundancia relativa de cada tipo celular sobre el total de viables. A partir de aquí en ambos casos se determinaron la poblaciones celulares obtenidas y se representan como porcentajes del total.

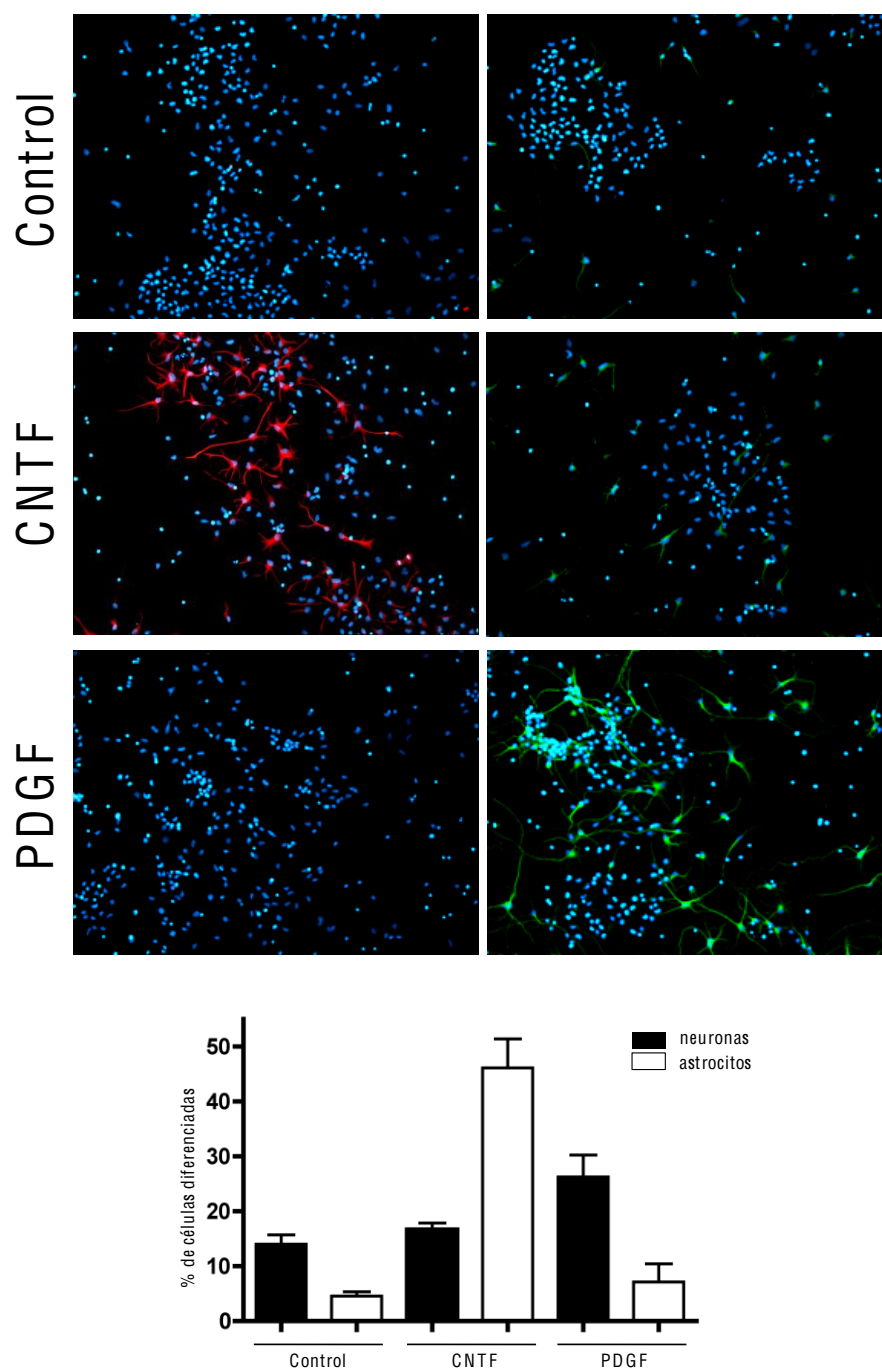


Figura 1. Multipotencia de los NPs. Inmunocitoquímica de NPs E14 crecidos durante cinco días *in vitro* y tratados con CNTF 1ng/ml o PDGF 10ng/ml durante 48h. Anticuerpos específicos contra GFAP (canal rojo) y β III-Tubulina (canal verde) fueron utilizados para cuantificar el

número de astrocitos y neuronas, respectivamente. Para cuantificar el número total de células, los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33342 (canal azul).

Los resultados mostrados en la Figura 1 revelan la naturaleza indiferenciada de los NPs dado que sin la adición de ningún factor exógeno no se produce diferenciación residual, mientras que solo la adición de los distintos compuestos exógenos son capaces de dirigir la diferenciación de células que son β III-Tubulina (potencialmente neuronas) o GFAP-positivas (potencialmente astrocitos). Por todo ello consideramos que los cultivos de NPs son un buen modelo celular para el estudio de la vía de señalización de NRG1-ErbB4 en desarrollo y destino celular, objetivo principal de la Tesis Doctoral que aquí se presenta.

Dinámica intracelular del receptor ErbB4 tras estimulación con NRG1 en NPs

Tras comprobar la naturaleza indiferenciada de los NPs continuamos estudiando la vía de señalización de NRG1-ErbB4 en desarrollo y destino celular. Resultados del laboratorio del Dr. Corfas demostraron la expresión del receptor ErbB4 en dichos cultivos primarios obtenidos de cortezas cerebrales de embriones de rata E14. Estos NPs sólo expresan la isoforma JM-a del receptor ErbB4, activable por NRG1 (20).

Para comprobar que en precursores neuronales, el receptor endógeno ErbB4 interacciona con NRG1 y es capaz de autofosforilarse, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con anticuerpos contra ErbB4 en NPs tratados con o sin NRG1 (1nM) durante 5 minutos. Como se observa en la figura 2A, el tratamiento con NRG1 provoca la fosforilación del ErbB4 en los NPs. Así mismo se confirmó que dicho tratamiento promovía la liberación del dominio intracelular de 80KD de ErbB4 en NPs. (Figura 2B).

Ensayos de doble híbrido realizados en el laboratorio del Prof. Corfas sugerían que el dominio citoplasmático de ErbB4 formaba, tras su liberación, un complejo con TAB2 y N-CoR. Por tanto, para comprobar la existencia del complejo ErbB4-TAB2-N-CoR y poder así investigar otros componentes potenciales del mismo, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación con el antisuero contra ErbB4 tras el tratamiento con NRG1 (1nM durante 30 minutos). Nuestros

resultados claramente confirman la presencia de las proteínas endógenas TAB2 y N-CoR (inmuno-detectadas mediante anticuerpos comerciales específicos) asociadas al receptor ErbB4 tras el tratamiento con NRG1 (Figura 2C).

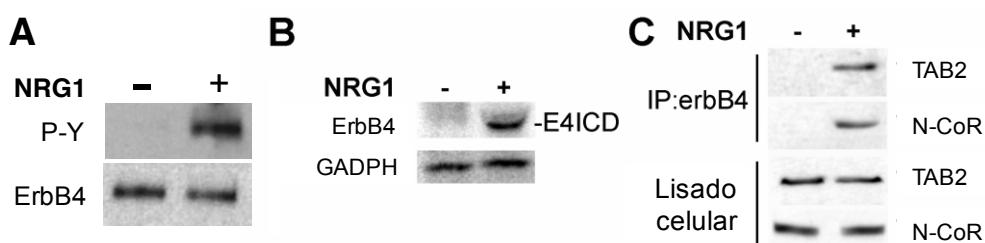


Figura 2. Dinámica intracelular del receptor ErbB4 en NPs inducidos con NRG1. (A) Inmunoprecipitación mediante el anticuerpo contra ErbB4 en cultivos primarios de precursores tratados con (+) o sin (-) NRG1. *Western blot* con anticuerpos específicos contra fosfotirosina (P-Y) y contra ErbB4. (B) Procesamiento de ErbB4. Los NPs fueron tratados con NRG1 (+) o con su vehículo (DMSO) (-) y las fracciones citoplasmáticas fueron sometidas a *Western blot* con anticuerpos específicos contra ErbB4. GADPH fue usado como control citosólico de carga. E4ICD: Dominio intracelular de ErbB4. (C) Interacción de ErbB4 con TAB2 y N-CoR. Inmunoprecipitación mediante el anticuerpo contra ErbB4 en cultivos primarios de NPs tratados con NRG1 (+) o con su vehículo (-). *Western blot* con anticuerpos específicos contra TAB2 y N-CoR.

Identificación de los componentes proteicos asociados a E4ICD

Con el estudio de la dinámica intracelular del receptor ErbB4 en NPs hemos establecido las herramientas de trabajo necesarias para poder abordar uno de los objetivos de este proyecto: analizar el complejo multiproteico asociado a E4ICD identificando con ello nuevas proteínas vinculadas a la ruta de señalización NRG1-ErbB4. Para ello utilizamos como herramienta las fusiones del dominio carboxilo terminal del receptor ErbB4 con un epítipo de la proteína LexA en un vector de expresión: LexA-E4ICD wt. Asimismo, utilizamos fusiones del dominio carboxilo terminal del receptor ErbB4 mutado puntualmente con un epítipo de la proteína LexA en un

vector de expresion: LexA-E4ICD kd (abreviatura del ingles, kinase dead) de manera que el dominio kinasa de dicha fusion no es funcional, es incapaz de autofosforilarse (93).

Inmunoprecipitar suficiente cantidad de complejos multiproteicos a partir de NPs, para su posterior análisis por espectrometría de masas, es técnicamente complicado y extremadamente costoso usando exclusivamente las células primarias. Por ello, para la identificación de las proteínas asociadas a E4ICD mediante inmunoprecipitación recurrimos a un sistema heterólogo, las células 293T que habían sido previamente transfectadas con la proteína de fusión LexA-E4ICD wt.

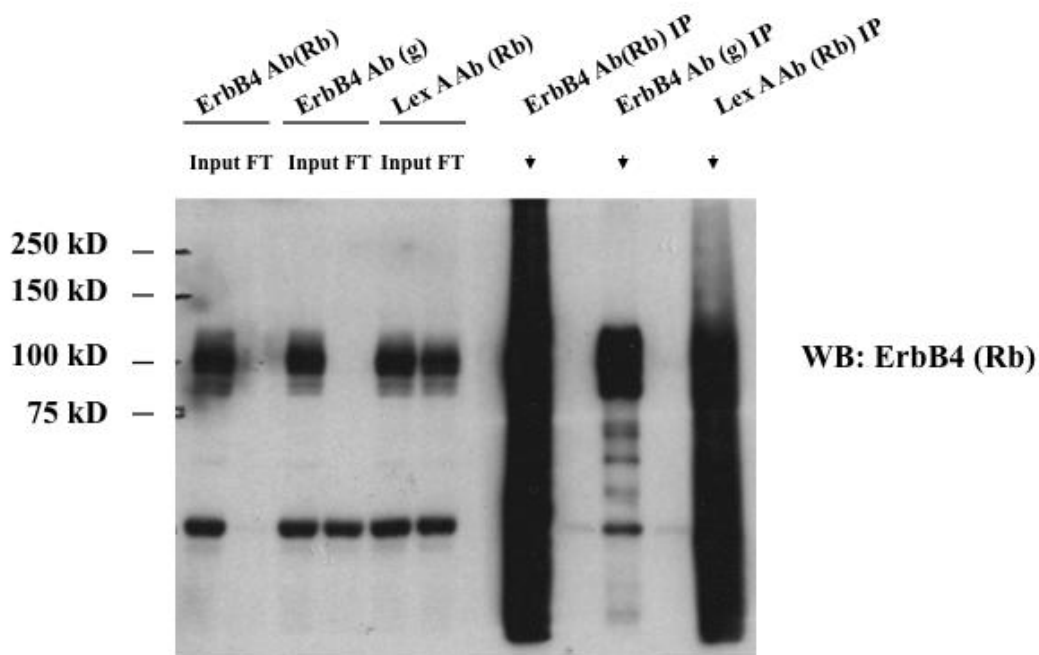


Figura 3. Inmunoprecipitación mediante distintos anticuerpos (ErbB4 de conejo (Rb), ErbB4 de cabra (g) y LexA de conejo(Rb)) de células 293T transfectadas con la proteína de fusión LexA-E4ICD wt. *Western blot* con anticuerpo específico contra ErbB4

Para la puesta a punto del sistema se utilizaron varios anticuerpos comerciales específicos contra la proteína ErbB4 con el fin de obtener el mejor resultado de la inmunoprecipitación (Figura 3). Como se observa en la figura 3 el anticuerpo que dio mejores resultados fue ErbB4 de cabra conjugado con bolitas de agarosa (AG) de Santa Cruz (ErbB4 AG). Posteriormente, los

extractos de inmunoprecipitación se separaron electroforéticamente en un gel y se tiñeron con el colorante Coomassie Blue R-250 para poder visualizar las bandas de las proteínas co-precipitadas con el anticuerpo específico contra ErbB4. Para el procesamiento del gel y purificación de los péptidos, se procedió a dividir el gel en sectores según peso molecular para facilitar su procesamiento y posterior análisis (Figura 4). Los experimentos se realizaron por triplicado y en todos ellos se analizó el porcentaje de cobertura de la secuencia de ErbB4 como control de la inmunoprecipitación (Figura 5A). Así mismo, en todos los experimentos se usaron en paralelo controles con IgG genérica para evitar uniones inespecíficas. Las muestras fueron analizadas finalmente mediante espectrometría de masas por el servicio de proteómica del Children's Hospital of Boston.

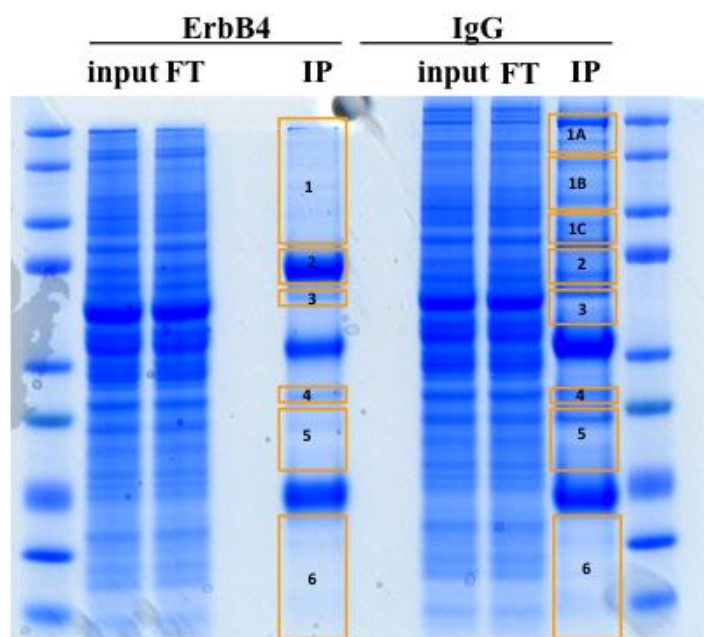


Figura 4. Separación de las proteínas en gel de agarosa. SDS-PAGE teñido con Coomassie R-250 y esquema de la separación por sectores del gel de agarosa.

Los resultados obtenidos sugieren que el dominio intracelular de ErbB4 se asocia a la proteína a la proteína MKLP1 (Figura 5B) también conocida como Kif 23, kinesina motora que actúa en la interzona del huso mitótico, entre otras localizaciones (con un porcentaje de cobertura de la secuencia del 21%); a la proteína nuclear PARP1 (Figura 5C) con un porcentaje de

cobertura de la secuencia del 36%) y a RACGAP1, con un porcentaje de cobertura de la secuencia de un 20% (Figura 5D). En la figura 5E se muestra el control de la inmunoprecipitación. Asimismo, las proteínas detectadas que fueron sometidas a un estudio posterior no se encontraron en la inmunoprecipitación paralela con IgG genérico, el cual hemos usado como control para evitar uniones inespecíficas.

A

1	MKPATGLWVW	VSLVAAAGTV	QPSDSQSVCA	GTEKNLSSLS	DLEQQYRALR
51	KYYENCEVVM	GNLEITSIEH	NRDLSFLRSV	REVTGYVLVA	LNQFRYLPLE
101	NLRIIRGTKL	YEDRYALAI	LNRYKDGNGF	LQELGLKNLT	EILNGGVYVD
151	QNKFLCYADT	IHWQDIVRNP	WPSNLTIVST	NGSSGCGRCH	KSTGRCWGP
201	TENHCQTLTR	TVCAEQCDGR	CYGPYVSDCC	HRECAGGCSG	PKDTCDFACM
251	NFNDSGACVT	QCPQTFVYNP	TTFQLEHNEN	AKYTYGAFCV	KKCPHNFVVD
301	SSSCVRACPS	SKMEVEENGI	KMCKPCTDIC	PKACDGIGTG	SLMSAQTVDS
351	SNIDKFINCT	KINGNLIFLV	TGIGHDPYNA	IEAIDPEKLN	VFRTVREITG
401	FLNIQSWPPN	MTDFSVCNLS	VTIGGRVLYS	GLSLLILKQQ	GITSLOFQSL
451	KEISAGNIYI	TDNSNLCCYH	TINWTLFST	INQIRIVIRD	RKAENCTAEG
501	MVCNHLCSDD	GCWGPQDQC	LSCRRFSRGR	ICIESCNLYD	GEFREFENG
551	ICVECDPQCE	KMEDGLLTCH	GPGPDNCTKC	SHFKDGPNCV	EKCPDGLQGA
601	NSFIFKYADP	DRECHPCHPN	CTQGCNGPTS	HDCIYYPWTG	HSTLPQHART
651	PLIAGVIGG	LFILVIVGLT	FAVYVRRKSI	KKKRALRRFL	ETELVEPLTP
701	SGTAPNQAQL	RILKETELKR	VKVLGSGAFG	TVYKGIWVPE	GETVKIPVAI
751	KILNETTGPK	ANVEFMDEAL	IMASMDPHPL	VRLLGVCLSP	TIQLVTQLMP
801	HGCLLEYVHE	HKDNIGSQLL	LNWCVQIAKG	MMYLEERRLV	HRDLAARNVL
851	VKSPNHVKIT	DFGLARLLEG	DEKEYNADGG	KMPIKWMAL	CIHYRKFTHQ
901	SDVSVYGVTI	WELMTFGGPK	YDGIPTRTIP	DLLEKGERLP	QPPICTIDVY
951	MMVVKCWMID	ADSRPKFKEL	AAEFSSRMARD	PQRYLVIQGD	DRMKLPSPND
1001	SKFFQNLLE	EDLEDMMAE	EYLVPAQAFNI	PPPIYTSRAR	IDSNRSEIGH
1051	SPPPAYTPMS	GNQFVYRDGG	FAAEQGVSV	YRAPTSITPE	APVAQGATAE
1101	IFDDSCCNGT	LKPVAPHVQ	EDSSTQRYSA	DPTVFAPERS	PRGELDEEGY
1151	MTFMRDKPKQ	EYLNPEVENP	FVSRRKNGDL	QALDNPEYHN	ASNGPPKAED
1201	EYVNEPLYLN	TFANTLGKAE	YLKNNILSMP	EKAKKAFDNP	DYWNHSLPPR
1251	STLQHPDYLO	EYSTKYFYKQ	NGRIRPIVAE	NPEYLSEFSL	KPGTVLPPPP
1301	YRHRNTV				

ErbB4

B

1	MKSARAKTPR	KPTVKKGSQT	NLKDPVGVYC	RVRPLGFDPQ	ECCIEVINNT
51	TVQLHTPEGY	RLNRNGDYKE	TQYSFKQVFG	THTTQKELFD	VVANPLVNDL
101	IHGKNGLLFT	YGVTSKGKTH	TMTGSPGEGG	LLPRCLDMIF	NSIGSFQAKR
151	YVFKSNDNRN	MDIQCEVDAL	LERQKREAMP	NPKTSSSKRQ	VDPEFADMIT
201	VQEFCKAEV	DEDSVYGVFV	SYIEIYNNYI	YDLLEEVFPD	PIKPKPPQSK
251	LLREDKNHNM	YVAGCTEVEV	KSTEEAFEVF	WRGQKKRRIA	NTHLNRESSR
301	SHSVFNIKLV	QAPLDADGDN	VLQEKEQITI	SQSLSLVDLAG	SERTNRTRA
351	GNRLREAGNI	NQSLMTLRTC	MDVLRENQMY	GTNKMVPYRD	SKLTHLFKNY
401	FDGEGKVRMI	VCVNPKAEDY	EENLQVMRFA	EVTQEVEVAR	PVDKAICGLT
451	PGRRYRNQPR	GPVGNELPVT	DVVLSQSFPL	PSCEILDIND	EQTLPRLIEA
501	LEKRHNLRQM	MIDEFNKQSN	AFKALLQEFD	NAVLSKENHM	QGKLNEKEKM
551	ISGQKLEIER	LEKKNKTLEY	KIEILEKTTT	IYEEDKRNLO	QELTONQKL
601	QRQFSDKRRL	EARLQGMVTE	TTMKWEKECE	RRVAAKQLEM	QNKLMVKDEK
651	LKQLKAIVTE	PKTEKPERPS	RERDREKVTO	RSVSPSPVPL	SSNYIAQISN
701	GQQLMSQPQL	HRRSNSCSSI	SVASCISEWE	QKIPTYNTPL	KVTSIARRRQ
751	QEPGQSKTCI	VSDRRRGMVW	TEGREVVPTF	RNEIEIEEDH	CGRLLFQPDQ
801	NAPPFIRLHR	RSRSAGDRWV	DHKPASNMQT	ETVMQPHVPH	AITVSVANEK
851	ALAKCEKMYL	THQELASDGE	IETKLIKGD	YKTRGGGQSV	QFTDIETLKQ
901	ESPNGSRKRR	SSTVAPAQPD	GAESEWTDVE	TRCSVAVEMR	AGSQLGPGYQ
951	HHAQPKRKKP				

Kif23

C

1	AESSDKLYRV	EYAKSGRASC	KKCSIESIPKD	SLR MAIMVQS	PMFDGK VPHW
51	YHFSDFWVKG	HSIR HPDVEV	DGFSEL RWDD	QQKVKKTAEA	GGVTGKGQDG
101	IGSKAEK TLG	DFAAEYAKSN	RSTCKGCMK	IEKGQVRLSK	KMVDPEKPQL
151	GMIDR WYHPG	CFV KNREELG	FRPEYSASQL	KGFSLLATED	KEALKKQLPG
201	VKSEGRKRGD	EVDGVDEVAK	KKSKEKDKD	SKLEKALK QAQ	NDLIWNHIDE
251	LKKVC STNDL	KELLIFNK QQ	VPSGESAILD	RVADGMVFGA	LLPCEECSSGQ
301	LVFKSDAYYC	TGDTVATWKC	MVKTQTPNRK	EWVTPKEFRE	ISYLKKLKVK
351	KQDR IFPPET	SASVAATPPP	STASAPAAVN	SSASADKPLS	NMKILTLGKL
401	SRNKDEVKAM	IEKLGKLTG	TANK ASLCIS	TKKEVEKMNK	KHEEVKEANI
451	RVVSEDFLQD	VSASTKSLQE	LFLAHILSPW	GAEVKAEPVE	VVAPRGKSGA
501	ALSKKSKGQV	KEEGINKSEK	RMKLT LKGGA	AVDPDSGLEH	SAHVLEKGGK
551	VFSATLGLVD	IVKGTNSYYK	LQLLEDDKEN	RYWIFRSWGR	VGTVIGSNKL
601	EQMPKEDAI	EHFNKLYEEK	TGNAWHSKNF	TKYP KKFYPL	EIDYGQDEEA
651	VKKLT VNPGT	KSKLKPQVQD	LIKMI FDVES	MKKAMVEYEI	DLQKMPLGKL
701	SKRQIQAAYS	ILSEVQQAVS	QGSDDSQILD	LSNR FYTLIP	HDFGMMKPPL
751	LNNADSVQAK	VEMLDNLDDI	EVAYSLLRGG	SDDSSKDPID	VNYEKLKTDI
801	KVVDRDSEEA	EIIRKYVRNT	HATTHNAYDL	EVIDIFKIER	EGECQRYKPF
851	KQLHNRRLLW	HGSR TTFNAG	ILSQGLRIAP	PEAPVTGYMF	GKGIYFADHV
901	SKS ANYCHTS	QGDPIGLILL	GEVALGNMYE	LKHASHISKL	PKGKHSVKGL
951	GKTTDPDSAN	ISLDGVDVPL	GTGISSGVND	TSLLYNEYIV	YDIAQVNLKY
001	LLKLKFNFKT	SLW			

Parp1

D

1	MDTMMNLVRN	LFEQLVRRVE	ILSEGNEVQF	IQLAKDFEDF	RKKWQRTDHE
51	LGKYKDLLMK	AETERSALDV	KLKHARNQVD	VEIKRRQRAE	ADCEKLERQI
101	QLIREMLMCD	TSGSIQLSEE	QKSALAPLNR	GQPSSSNAGN	KRLSTIDESG
151	SILSDISFDK	TDESLDWDSS	LVKTFKLKKR	EKRRTSRQF	VDGPPGPVKK
201	TRSIGSAVDQ	GNESIVAKTT	VTVPNDDGPI	EAVSTIETVP	YWTRSRRTGT
251	TLQPNWSDST	LNSRQLEPRT	ETDSVGTQPS	NGGMRHLDFV	SKTVIKPESC
301	VPCGKRIRFG	KLSLKCRDCR	VVSHPECRDR	CPLPCIPTLI	GTPV KIGEGM
351	LADFVSQTSP	MIPSI VVHCV	NEIEQRGLTE	TGLYRISGCD	RTVKELKEKF
401	LRVKTVPLLS	KVDDIHAICS	LLKDFLRNLK	EPLLTFRLNR	AFMEAAEITD
451	EDNSIAAMYQ	AVGELPQANR	DTLAFMLIHL	QRVAQSPHTK	MDVANLAKVF
501	GPTIVAHAVP	NPDVPTMLQD	IKRQPKVVER	LLSLPLEYWS	QFMMVEQENI
551	DPLHVIENSN	AFSTPQTEDI	KVSL LGPVTT	PEHQL LKTPS	SSSLSQVRVS
601	TLTKNTPRFG	SKSKSATNLG	RQGNFFASPM	L	

RACGAP1

E

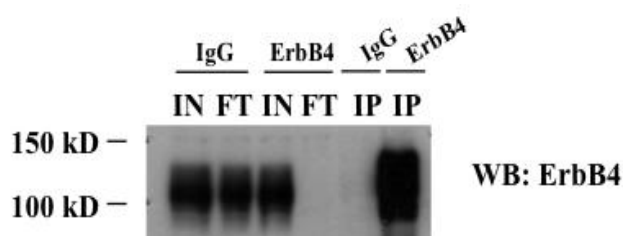


Figura 5. Caracterización de proteínas asociadas a ErbB4 mediante espectroscopía de masas. En rojo aparecen los péptidos que coinciden con la secuencia aminoacídica de (A) ErbB4 con un 34% de cobertura de su secuencia; (B) Kif23 con un 21% de cobertura de su secuencia; (C) Parp1 con un 36% de cobertura de su secuencia y (D) RACGAP1 con un 20% de cobertura de su secuencia peptídica y (E) Inmunoprecipitación mediante IgG y ErbB4 de células transfectadas con Lex E4ICD wt IN (Input) FT (flow through). *Western blot* con anticuerpo específico para ErbB4.

A partir de aquí nos proponemos dos vías de análisis que podrían ser independientes, primera, analizar la interacción de ErbB4 con la proteína motora Kif23. En este caso una proteína mayoritariamente citoplasmica; y en segundo lugar analizar la asociación del fragmento de ErbB4, con la proteína PARP1, en este caso una proteína mayoritariamente nuclear. En ambos casos con suficientes funciones conocidas pero en compartimentos celulares diferentes.

Kif 23 inmuno-precipita con E4ICD

Para verificar la unión específica de Kif23 al dominio E4ICD realizamos varios ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo específico contra ErbB4 AG y con IgG AG como control en células 293 transfectadas con la proteína de fusión LexA E4ICD wt, mediante lipofectamina-2000. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis de SDS-PAGE y posterior *Western blot*. Como se demuestra en la figura 6 la proteína Kif23, con un peso molecular de 110kD, tan solo precipita en presencia del anticuerpo ErbB4 no siendo así en el caso de la inmunoprecipitación con IgG AG (Figura 6).

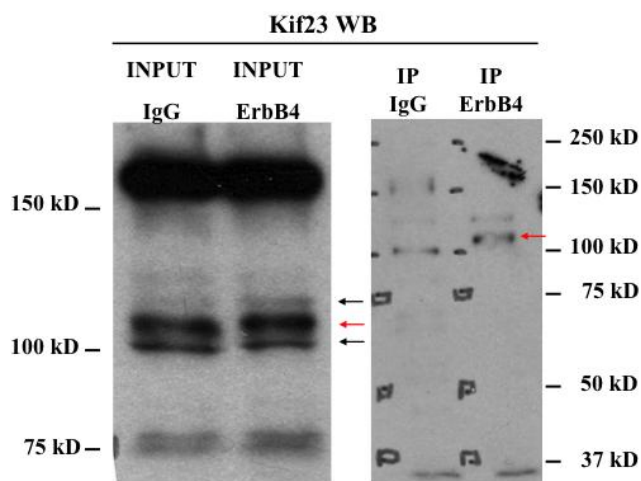


Figura 6. Asociación de Kif23 al E4ICD en células 293. Inmunoprecipitación mediante los anticuerpos ErbB4 AG e IgG AG en células 293 transfectadas con la proteínas de fusión LexA-E4ICD wt. *Western blot* con anticuerpos específicos contra Kif23.

Posteriormente realizamos otro ensayo en el que la inmunoprecipitación mediante ErbB4 se realizó en células transfectadas mediante lipofectamina-2000. En este caso usamos las proteínas de fusión LexA E4ICD wt y LexA E4ICD kd. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis de SDS-PAGE y posterior *Western blot*. Aunque ambas proteínas de fusión son inmuno-detectadas, tan solo la forma wt es fosforilable (Datos no mostrados). Como se puede observar en la Figura 7, Kif23 co-precipita tanto en muestras expresando LexA-E4ICD wt como en kd, sugiriendo que la unión no precisa de la actividad tirosina quinasa para la interacción de Kif23 y el receptor en su dominio intracelular. No podemos descartar la existencia de otras proteínas en la línea celular 293 capaces de fosforilar E4ICD en trans, promoviendo así su unión a la proteína Kif23.

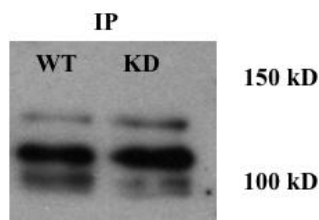


Figura 7. Asociación de Kif23 al E4ICD. Inmunoprecipitación mediante ErbB4 de células 293 transfectadas con las proteínas de fusión LexA-E4ICD wt (WT) y LexA-E4ICD kd (KD). *Western blot* con anticuerpos específicos contra Kif23.

Para comprobar dicha unión realizamos otro ensayo de inmunoprecipitación, en este caso con el anticuerpo específico contra Kif23, el cual conjugamos con bolitas de agarosa (Figura 8). Las células 293 fueron transfectadas con las proteínas de fusión LexA E4ICD wt y LexA E4ICD kd. Las muestras fueron separadas electroforéticamente y analizadas mediante *Western blot*. Como muestran los datos de la figura 8, ErbB4 inmunoprecipita en presencia de Kif23 tanto en células transfectadas con la construcción LexA E4ICD wt como en las transfectadas con la construcción LexAE4ICD kd. Estos datos confirman la unión de ErbB4 a kif23.

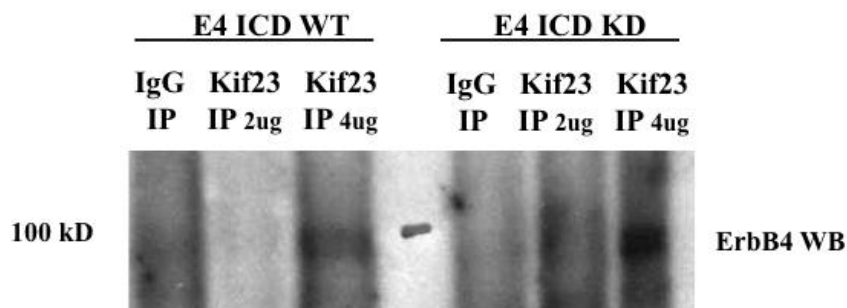


Figura 8. Asociación de Kif23 al E4ICD. Inmunoprecipitación mediante los anticuerpos específicos contra IgG AG y contra Kif23 conjugado con bolitas de agarosa en células 293 transfectadas con las proteínas de fusión LexA-E4ICD wt (WT) y LexA-E4ICD kd (KD). *Western blot* con anticuerpo específico contra ErbB4.

Asociación de Kif23 al E4ICD en NPs

Como los experimentos anteriores se realizaron en un sistema heterólogo usando las células HEK 293, decidimos comprobar que en precursores neuronales se producía la misma unión de Kif23 al receptor. Se procedió a la realización del mismo ensayo de inmunoprecipitación en este tipo celular. Se observa que Kif23 coprecipita con el receptor ErbB4 en neuroprecursores.

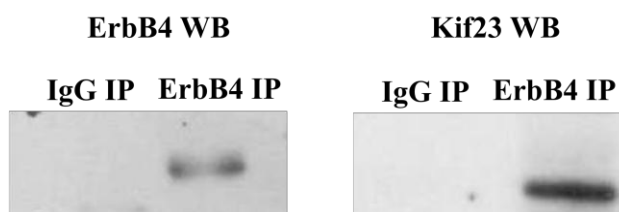


Figura 9. Asociación de Kif23 a ErbB4. Inmunoprecipitación mediante ErbB4 en NPs. *Western blot* mediante anticuerpos específicos contra ErbB4 y Kif23.

Caracterización de la expresión de Kif 23. Co expresión de Kif23 y β III-Tubulina en cultivos neuronales y en secciones corticales.

Kif23 es de proteína motora de la familia de las kinesinas, actúa como una enzima motora del extremo positivo de los microtúbulos.

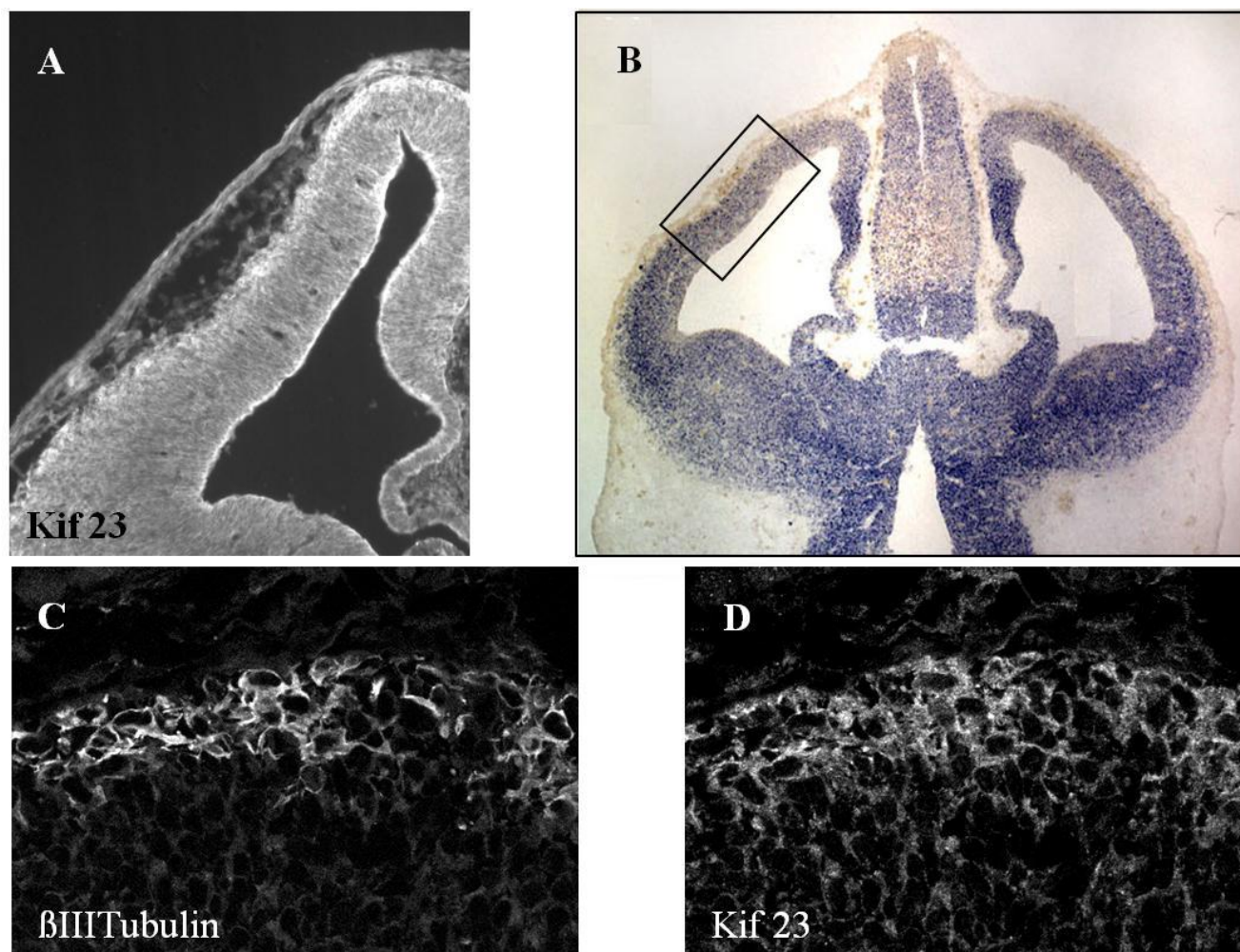


Figura 10. Co-Expresión de Kif23 y de β III-Tubulina en la corteza de embriones de ratón de 13 días. A) Expresión de Kif23 en la zona ventricular B) Visión de la zona ventricular seccionada C y D) Detalle de la zona apical del ventrículo. Inmunofluorescencia con anticuerpos específicos contra Kif 23 (C) y β III-Tubulina (D).

Para poder estudiar el papel de Kif23 en desarrollo de corteza, comenzamos por describir su expresión en secciones de corteza de embriones de 13 días y posteriormente en cultivos. En primer lugar, realizamos varios ensayos de inmuno-fluorescencia en los que se aislaron los cerebros de ratones de 13 días de desarrollo embrionario, fueron embebidos en OCT y cortados en el criostato. Las secciones fueron sometidas a inmuno-histoquímica con anticuerpos específicos contra Kif23 y contra β III-Tubulina. Los resultados mostrados en la figura 10 indican la presencia de Kif 23 en los territorios neurogénicos con una mayor intensidad de tinción en la región ventricular y en la capa más externa. El análisis en detalle de estas capas externas demuestra una imagen de células Kif23-positivas bastante análogas a las células β III-Tubulina-positivas, es decir, precursores del linaje neuronal (Figura 10).

Para comprobar su expresión en neuronas realizamos, en segundo lugar, cultivos de corteza de embriones E17 durante 4 días periodo tras el cual fueron fijadas para inmunocitoquímica con antisuero específico contra Kif23 y contra β III-Tubulina (Figura 11). Los resultados muestran la presencia de kif23 en las neuronas con una localización citoplasmática (Figura 11B).

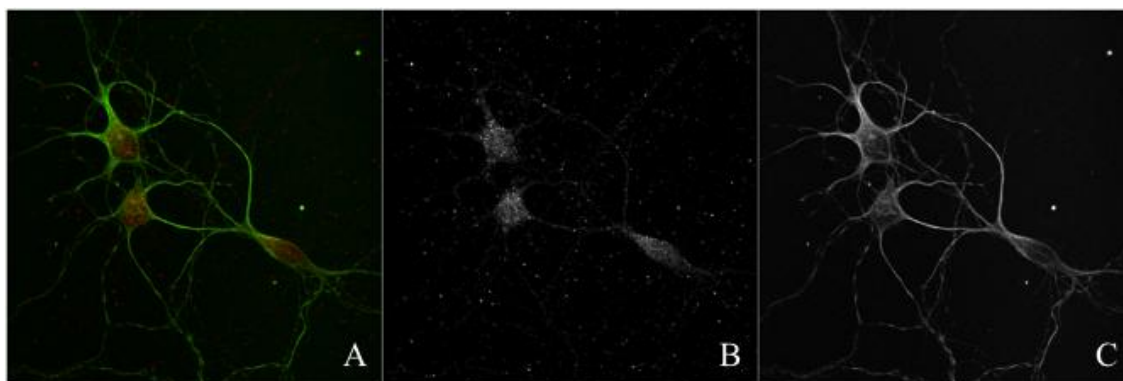


Figura 11. Inmuno-citoquímica de cultivos de corteza neuronal de embriones E17. A) Superposición de canales. B) Antisuero específico contra Kif23 (canal rojo), C) Antisuero específico contra β III-Tubulina (canal verde).

PARP1 inmuno-precipita con E4ICD

Como indicamos anteriormente el segundo tipo de interacción que pudimos detectar es con la proteína nuclear PARP1.

Para verificar la unión específica de PARP1 al dominio E4ICD realizamos varios ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo específico contra ErbB4 (y con IgG genérico como control) en células 293 transfectadas mediante lipofectamina-2000 con la proteína de fusión LexA E4ICD wt. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis y posterior *Western blot*. Como se demuestra en la figura 12A, la proteína Parp1 inmunoprecipita en presencia del anticuerpo ErbB4 no siendo así en el caso de IgG.

Para comprobar dicha unión realizamos otro ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo específico contra Parp1, el cual conjugamos con bolitas de agarosa. Las células 293 fueron transfectadas con la proteína de fusión LexA-E4ICD wt. Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis y posterior *Western blot*. Como se demuestra en la figura 12B la proteína ErbB4 tan solo precipita en presencia del anticuerpo Parp1 no siendo así en el caso de IgG. A

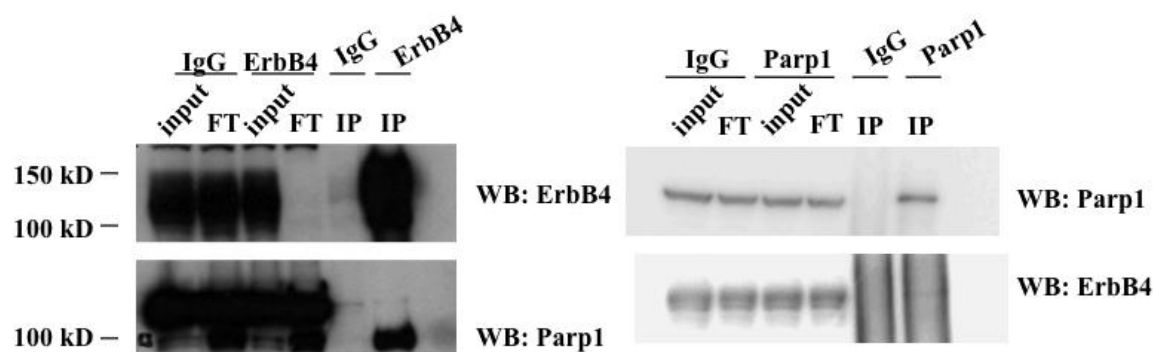


Figura 12. Asociación de PARP1 al E4ICD. A) Inmunoprecipitación mediante ErbB4 y IgG de células 293 transfectadas con las proteínas de fusión LexA-E4ICD wt. *Western blot* con anticuerpos específicos contra ErbB4 y Parp1. B) Inmunoprecipitación mediante Parp1 y IgG de

células 293 transfectadas con las proteínas de fusión LexA-E4ICD wt. *Western blot* con anticuerpos específicos contra Parp1 y ErbB4.

Para comprobar si la interacción era dependiente de la posible actividad kinasa, realizamos otro ensayo de inmunoprecipitación mediante ErbB4. Este se realizó en células transfectadas mediante lipofectamina-2000 en este caso con las proteínas de fusión LexA E4ICD wt y LexA E4ICD kd, así como en células sin transfectar (NT). Aunque ambas proteínas de fusión son inmuno-detectadas, tan solo la forma wt es fosforilable (Figura 13). Las muestras fueron analizadas mediante electroforesis y posterior *Western blot*. Los datos indican que, PARP1 co-precipita tanto en muestras expresando LexA-E4ICD wt cómo en la variante mutada, kd, sugiriendo que dominio quinasa “activo”, no es relevante para la unión de PARP1 al receptor en su forma intracelular. Si bien, no podemos descartar la existencia de otras proteínas en la línea celular 293 capaces de fosforilar E4ICD en trans, promoviendo así su unión a la proteína nuclear PARP1.

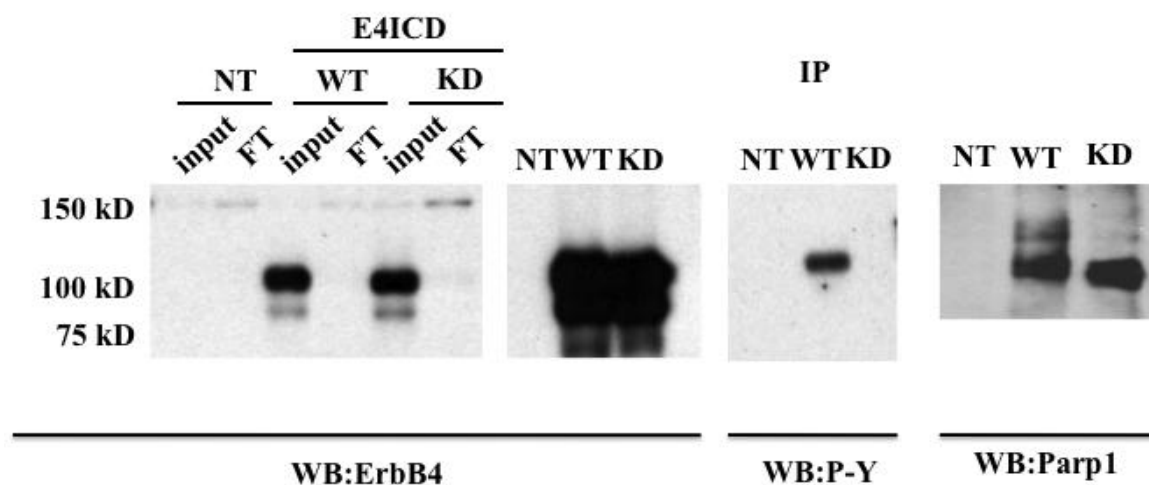


Figura 13. Asociación de PARP1 al E4ICD. Inmunoprecipitación mediante ErbB4 de células 293 sin transfectar (NT) o bien transfectadas con las proteínas de fusión LexA-E4ICD wt (WT) y LexA-E4ICD kd (KD). *Western blot* con anticuerpos específicos contra ErbB4, P-Y y Parp1.

Asociación de PARP1 al E4ICD en NPs

Considerando que el sistema anterior es heterólogo ya que se usan proteínas transfectadas y las células HEK293, decidimos comprobar que en precursores neuronales se producía la misma unión de PARP1 al receptor endógeno. Se procedió por tanto a la realización del mismo ensayo de inmunoprecipitación en este tipo celular.

A partir de las electroforesis y posterior *Western Blot*, se puede observar que PARP1 coprecipita con el receptor ErbB4 en neuroprecursores tan solo en presencia de NRG1 (Figura 14). Esto sugeriría fuertemente que es necesaria la activación del receptor y probablemente la formación del dominio intracelular del mismo para que exista una interacción entre el E4ICD y PARP1 en NPs.

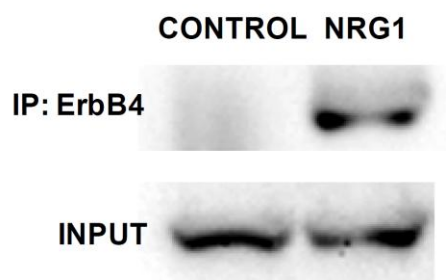


Figura 14. Asociación de PARP1 al E4ICD en NPs. Inmunoprecipitación mediante ErbB4 en NPs tratados con NRG1 o con su vehículo. *Western blot* mediante anticuerpos específicos contra PARP1.

PARP1 se asocia al promotor de *GFAP* tras estimulación con NRG1

La astrogénesis ocurre de manera precoz en ratones que han sufrido una delección del gen *ErbB4*. Así mismo, resultados previos del laboratorio sugieren que la vía de NRG1-ErbB4 promueve la represión de genes gliales. Dado que no existe en la secuencia del E4ICD un dominio de unión a ADN pensamos que dicha unión se podía deber a la asociación de Parp1 que por el contrario es capaz de unirse al ADN.

Mas aún, dado que PARP1 es conocido como una proteína de interacción con el ADN en procesos de reparación del material genético y también ha sido descrita su participación como co-activador/represor transcripcional, nos propusimos estudiar su papel en la represión que ejerce ErbB4 sobre la expresión de los genes de diferenciación glial.

Para ensayar la posible asociación de PARP1 con el promotor de *GFAP* realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina con antisuero específico para el reconocimiento de ErbB4 así como para el de PARP1. Tras dicha inmunoprecipitación, la presencia de la secuencia promotora de *GFAP* fue investigada mediante PCR con cebadores específicos (Figura 15).

Nuestros resultados indican que la estimulación de NPs con NRG1 resulta en una eficiente inmunoprecipitación de la secuencia promotora de *GFAP* con anti-ErbB4 (Figura 15). La inmunoprecipitación con anti-PARP1 generaba el mismo resultado que con anti-ErbB4 sugiriendo que ambas proteínas interaccionan entre ellas y con el promotor *GFAP* para promover su represión (Figura 15). A partir de aquí nos propusimos estudiar la naturaleza del complejo y su asociación al ADN para dilucidar si en efecto, como sugieren los resultados, la unión del complejo al material genético se realiza a través de PARP1 o si existen otros elementos del complejo necesarios para la unión.

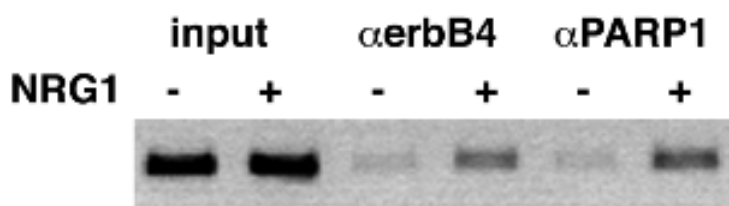


Figura 15. Asociación de ErbB4 y PARP1 a la secuencia promotora de *GFAP*. Los NPs fueron tratados con (+) o sin (-) NRG1 durante 6 horas y sometidos a inmuno-precipitación de cromatina con antisueros contra ErbB4 y PARP1. El Input recoge los datos de amplificación del Promotor *GFAP* previo a la inmuno-precipitación.

PARP1 es necesario para la actividad represora de E4ICD sobre *GFAP*

Para detallar un poco más la naturaleza y la funcionalidad del complejo nos propusimos estudiar el papel de esta interacción en la represión que el E4ICD genera sobre la expresión de *GFAP* y conocer un poco mas como actúan a nivel del ADN. Realizamos para ello un ensayo de activacion del promotor *GFAP* en el que medimos la inducción del *GFAP* mediante actividad luciferasa. Las células fueron cultivadas y co-transfectadas con construcciones plasmídicas donde la luciferasa es expresada bajo el control del promotor del *GFAP* (P_{GFAP}) y donde, la proteína control Renilla es expresada a su vez desde el promotor de la timidina quinasa (tk). A continuación, las células se trataron con CNTF, NRG1 y con 3-ABA (inhibidor de PARP1).

Como ya hemos mencionado, mientras que el CNTF induce la transcripción de *GFAP*, la NRG1 interviene en su represión. Los datos indican primero que CNTF genera una activación transcripcional que es en parte inhibida por la activación de NRG1, y que cuando PARP1 es inactivada por su sustrato suicida 3-ABA, se pierde la actividad represora de E4ICD iniciada a un nivel superior por NRG1(Figura 16). El hecho de que PARP1 forme complejo con el E4ICD sugiere que la actividad de PARP1 es necesaria para la funcionalidad nuclear de ErbB4 a nivel de transcripción y que la unión al ADN se realiza muy probablemente a nivel de PARP 1 ya que su inactivación química bloquea la represión que ejerce sobre la expresión de *GFAP*.

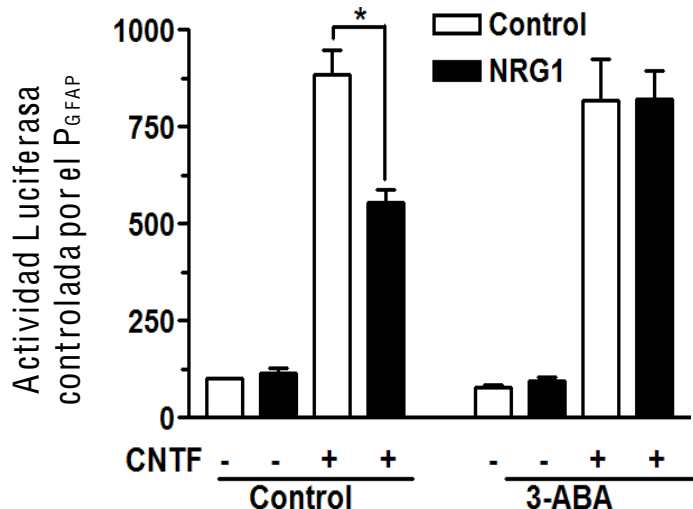


Figura 16. El inhibidor de PARP1, 3-ABA, bloquea la represión ejercida por NRG1 en la activación del promotor *GFAP* inducida por CNTF. Los NPs fueron co-transfectados con los reporteros *GFAP*-luciferasa y TK-Renilla. Las células fueron tratadas sin (-) o con (+) NRG1 1nM, CNTF 1ng/ml y 3-ABA 0.1nM. Tras 9 horas de incubación, los NPs fueron lisados y la actividad luciferasa medida y expresada tal y como se indica en materiales y métodos. * $P < 0.005$.

La represión de la transcripción mediada por NRG1-ErbB4 se realiza a través del sitio de unión de CSL en el promotor de *GFAP*.

La vía de Notch y la de ErbB4 son vías antagónicas que confluyen sobre el Promotor de *GFAP* induciendo o reprimiendo su actividad, promoviendo astrogénesis o neurogénesis respectivamente. En el caso de Notch, su NICD se une al promotor de *GFAP* por el sitio de unión de los factores de transcripción CSL que corresponde a las siglas del factor según la especie (CBF1 en el caso de mamíferos, Su de *Drosophila* y Lag-1 de *Caenorhabditis elegans*) (31). Para investigar el mecanismo mediante el cual la vía de señalización NRG1/ErbB4 promueve la represión de *GFAP* recurrimos a una construcción de la que disponíamos en el laboratorio en la cual el gen de la luciferasa está bajo el control del promotor de *GFAP* mutado en el sitio de unión de CSL (Figura 17). En dicha construcción existe una mutación en la que se sustituyen dos cisteínas (C) del promotor original (wt) por dos adeninas (A) en lo que hemos denominado como Promotor *GFAP* mutante (mut). Esta zona del promotor es fundamental para

la unión de los factores de transcripción CSL y se ha comprobado que dicha mutación hace al promotor de *GFAP* menos sensible frente a la forma activa de Notch (29).

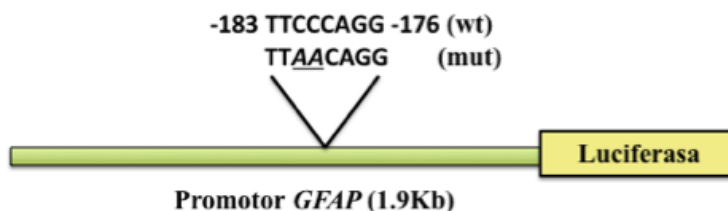


Figura 17. Representación del promotor de *GFAP* (wt) y (mut) . Mutación del sitio de unión de CSL al Promotor de *GFAP*. La posición -183 (5-TTCCCAGG-3') fue mutada obteniendo (5-TTAACAGG-3').

Realizamos un ensayo en el que medimos la inducción del *GFAP* mediante actividad luciferasa. Las células fueron cultivadas y co-transfectadas con construcciones plasmídicas donde la luciferasa es expresada bajo el control del promotor del *GFAP* mutado ($P_{GFAP\ mut}$) y el promotor sin mutación ($P_{GFAP\ wt}$) y donde, la proteína control Renilla es expresada a su vez desde el promotor de la timidina quinasa (tk). Los valores obtenidos se expresan como actividad luciferasa relativa: Luciferasa/Renilla.

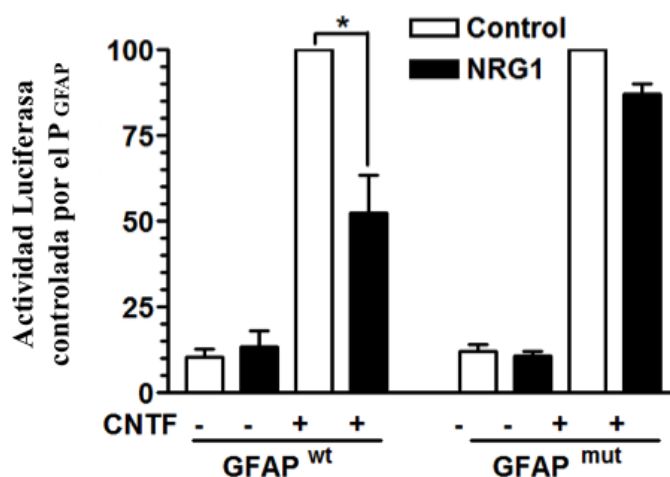


Figura 18. *GFAP* mut, impide la represión ejercida por NRG1 en la activación del promotor *GFAP* inducida por CNTF. Los NPs fueron co-transfectados con los reporteros

GFAP-luciferasa (wt y mut) y TK- Renilla. Las células fueron tratadas sin (-) o con (+) NRG1 1nM, CNTF 1ng/ml. Tras 9 horas de incubación, los NPs fueron lisados y la actividad luciferasa medida y expresada tal y como se indica en materiales y métodos. *P<0.005.

A continuación, las células se trataron con CNTF (como inductor exógeno) y NRG1, de la que sabemos que reprime la acción generada por CNTF. Como se observa en la figura 18 en la construcción mutada se reduce la represión de la transcripción en presencia de NRG1. Estos resultados sugieren que el sitio de unión de CSL tiene un papel importante en la represión de la transcripción mediada por la vía NRG1/ErbB4. Esta podría ocurrir mediante la unión del complejo E4ICD-PARP1 al promotor de *GFAP* a través del sitio de unión de CSL promoviendo así el bloqueo transcripcional de la proteína fibrilar ácida glial.

Las proteínas ortologas CBF1/Rbpj (mamíferos), Su (H) (*Drosophila*), y Lag-1 (*Caenorhabditis elegans*) componen la familia de factores de transcripción CSL con una secuencia específica de unión al ADN. Para comprobar si la unión del complejo al P_{GFAP} a través del sitio de CSL implicaba la unión física del factor de transcripción al complejo, realizamos un ensayo de inmuno-precipitación de la cromatina tanto con antisuero específico para el reconocimiento de CBF1 como para el de ErbB4 como control. Tras realizar la inmunoprecipitación como se describe en materiales y métodos, la presencia de la secuencia promotora de *GFAP* fue detectada mediante PCR con cebadores específicos (Figura 19).

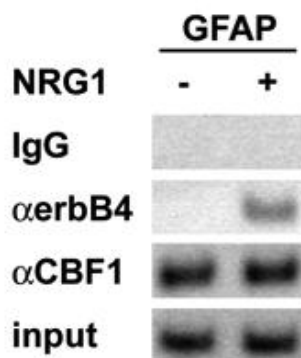


Figura 19. Asociación de ErbB4 y CBF1 a la secuencia promotora de *GFAP*. Los NPs fueron tratados con (+) o sin (-) NRG1 durante 6 horas y sometidos a inmuno-precipitación de

cromatina con antisueros contra ErbB4 y CBF1. El input recoge los datos de amplificación del P_{GFAP} previo a la inmunoprecipitación.

Como era esperable, la estimulación de NPs con NRG1 resulta en una eficiente inmunoprecipitación de la secuencia promotora de *GFAP* con anti-ErbB4 (Figura 19). Las amplificaciones usando tanto material procedente de extractos no inmunoprecipitados (Input, figura 19) como material inmunoprecipitado con IgG de ratón no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, merece la pena destacar como la inmunoprecipitación con anti-CBF1 de GFAP se produce tanto en presencia como ausencia de NRG1, lo que indica la unión constitutiva al promotor

DISCUSION

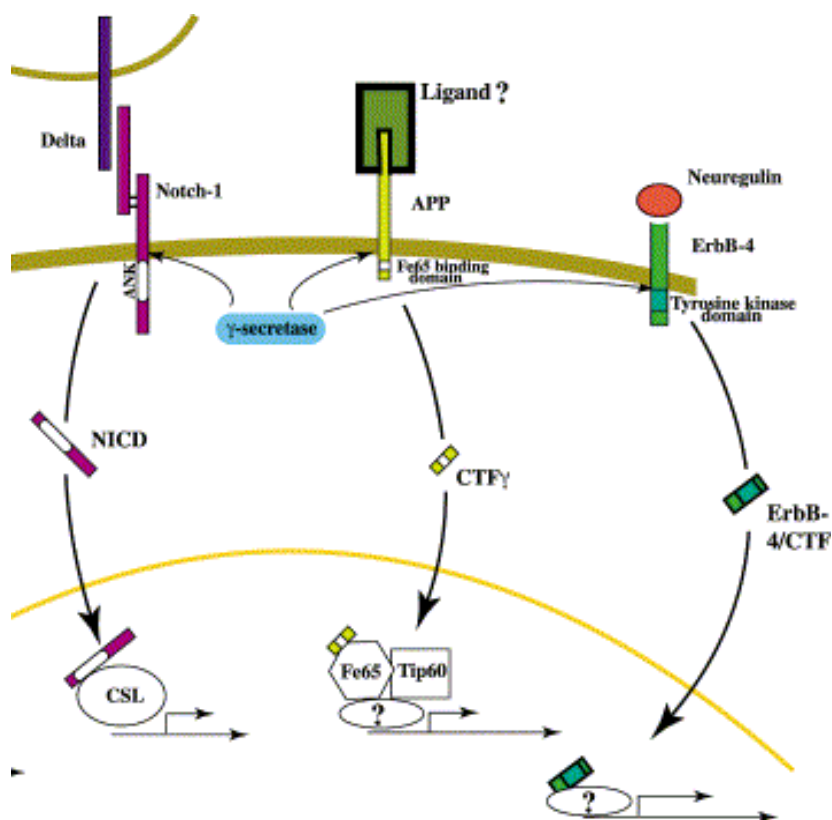
Los NPs son células indiferenciadas que pueden reprogramar su expresión génica para generar los distintos tipos de linajes neurales. Esta capacidad para responder ante estímulos externos hace de los NPs una excelente herramienta para realizar estudios de desarrollo, destino celular, búsqueda de nuevas drogas y tratamientos terapéuticos de desordenes neurológicos. A pesar de su enorme potencial, todavía es poco lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares que seleccionan un destino celular concreto dentro de su multipotencia. Por todo esto, el propósito de esta Tesis es explorar los mecanismos que determinan la diferenciación de los NPs a neuronas y astrocitos, concretamente los mecanismos mediante los que la ruta de señalización NRG1-ErbB4 gobierna la astrogenesis. La diferenciación secuencial de los NPs puede ser inducida *in vitro* indicando que la programación interna que determina el destino celular surge en respuesta a un estímulo externo. Nuestro laboratorio lleva años trabajando en la vía de señalización NRG1-ErbB4 como elemento fundamental en el desarrollo del cerebro. En el presente trabajo hemos utilizado NPs de cultivos primarios de telencéfalos de rata E14 para caracterizar la vía de señalización NRG1-ErbB4 durante el desarrollo embrionario. Este estudio demuestra como el receptor tirosina quinasa ErbB4, después de la unión del ligando, señala directamente al núcleo para regular la transcripción y así modular la diferenciación celular de los NPs.

Nuestros resultados sugieren que factores que inhiben la astrogénesis están presentes en estadios tempranos del desarrollo del cerebro (frente a una posible formación tardía de los factores que inducen la astrogénesis). Durante los estadios tempranos del desarrollo del cerebro, los NPs se exponen de manera simultánea a señales extracelulares que inducen la producción de neuronas y astrocitos siendo la neurogénesis favorecida mediante la señalización nuclear de ErbB4, que antagoniza las señales que promueven astrogénesis. Estos resultados se apoyan en dos observaciones: i) por un lado, aunque los NPs expresan ErbB2, este no es capaz de unir NRG1. Por tanto la señalización de NRG1 en NPs es exclusivamente dependiente de ErbB4 (isoforma JM-a) (88); ii) en segundo lugar existen estudios que demuestran que en estadios de desarrollo posteriores, la generación de astrocitos se ve favorecida por una notable reducción en los niveles de expresión de la proteína ErbB4 en los NPs (26). En conclusion, la ruta NRG1-ErbB4 controla la represión astrocítica tanto por la especificidad del par ligando-receptor como

por el control temporal de la abundancia relativa del receptor ErbB4 en NPs. Dado este sistema de regulación secuencial, alteraciones en la generación temporal de los astrocitos pueden tener consecuencias sobre etapas subsiguientes del desarrollo del cerebro. En este sentido, se ha demostrado que ratones que han sufrido una delección del gen *erbB4* tienen defectos en la migración neuronal tangencial (2, 25). Este tipo de migración se modula mediante señales producidas por astrocitos (66).

Mecanismo de activación de ErbB4. Generación de E4ICD mediante Presenilina

En los NPs, la NRG1 promueve la dimerización del receptor ErbB4. Esta dimerización estimula la fosforilación del receptor iniciando su activación. Una vez fosforilado, el receptor es susceptible de procesamiento proteolítico mediante un corte extracelular y otro intracelular que libera el dominio E4ICD al citoplasma. El corte de γ -secretasa no es exclusivo de ErbB4, también corta la proteína precursora del beta-amiloide (APP) y al receptor Notch, liberando en ambos casos su dominio intracelular (AICD, NICD, respectivamente) que se translocan al núcleo para actuar como reguladores de la transcripción (Esquema 1). Dada esta multifunción de la presenilina/ γ secretasa en distintas rutas de señalización, se han observado efectos pleiotrópicos en pacientes de Alzheimer (AD) (43) que presentaban altos niveles de ErbB4 no procesado alrededor de placas neuríticas (14).



Esquema 1. Vías de señalización dependientes de Presenilina

La pérdida total de la actividad mediada por presenilina implica alteraciones en la memoria y disfunciones sinápticas así como neurodegeneración sin la generación de placas amiloides (94).

Proteínas de unión a E4ICD

I Unión del E4ICD a Kif23.

De los datos de inmunoprecipitación hemos obtenido tres proteínas: Parp1, RACGAP1 y Kif23. Kif23 es miembro de la familia de proteínas del tipo kinesinas. Es una proteína motora del extremo positivo. Se expresa en mitosis y está implicada en la formación del surco de división en anafase tardía y en citocinesis. Kif23 forma parte del complejo *centralspindlin* junto con RACGAP1 (69, 78). El complejo se agrupa en la zona media del huso para permitir la anafase en

las células en división. Así mismo Kif23 está implicada en el crecimiento de las neuritas de neuronas post-mitóticas (121).

En la literatura la relación Kif23-receptores ErbB se limita a una correlación en los niveles de expresión de estas proteínas en ciertas células tumorales: en gliomas y en neuroblastomas (60, 86, 91, 105).

Nuestros datos muestran una interacción específica de la proteína Kif23 con el dominio intracelular del receptor ErbB4. Mas aún, la presencia de Kif23 aparece mayoritariamente en neuronas en cultivo lo que sugiere su participación en la señalización nuclear. Sin embargo, sorprendentemente, esta interacción no depende de estimulación por NRG1 ya que la variante E4ICDkd genera igualmente inmunoprecipitación de Kif23. Este hecho pudiera deberse a que esta interacción, bien directa o facilitada por otra proteína aun no identificada, se da en un motivo de ErbB4 distinto al tirosina quinasa. Dada las graves consecuencias para el desarrollo cerebral que puede tener una señalización al núcleo ineficiente, este hecho podría estar relacionado con la necesidad de tener un complejo de movilización del E4ICD establecido antes incluso de la estimulación por ligando. No obstante, no descartamos que el papel de Kif23 pueda ser también el de transportar el complejo al proteasoma, suponiendo por tanto un nivel adicional de regulación post-traducciona. A favor de esta hipótesis estaría el hecho de haber localizado kif23 mayoritariamente en el citoplasma de NPs en corteza, si bien es cierto que estos pudieran estar al menos en parte participando en otros procesos independientemente de ErbB4 (i.e. citocinesis). Deberíamos de poder definir en el futuro estos interrogantes así como la trascendencia de esta interacción dependiendo del momento del desarrollo: represión transcripcional astrocítica y divisiones de los precursores en el transcurso del desarrollo neuronal.

II. Unión del E4ICD a RACGAP1

La segunda proteína detectada en la IP inicial fue RACGAP1, proteína de la familia Rho-GTPasa descrita en la literatura por su asociación con Kif23 entre otras proteínas mitóticas (116).

III. Unión del E4ICD a Parp1 y represión de genes astrocíticos.

Formación del complejo ternario y translocación al núcleo

El significado biológico de la interacción con el par TAB2/N-CoR es de momento incierto pero pudiera actuar imprimiendo una señal de localización nuclear a las proteínas con las que se asocia o bien participando de la actividad reguladora de la transcripción una vez que el dominio citosólico ha sido internalizado al núcleo. Aunque no se pueden descartar otras posibilidades junto a estas anteriores, al menos para el caso de E4ICD, parece claro que su localización nuclear no depende de la formación del complejo ternario aunque este sí que sea esencial para su actividad reguladora de la transcripción. Es posible que la secuencia reconocida por la gamma secretasa pudiera ser a su vez la tarjeta de identidad de la proteína para ser reconocida por TAB2/N-CoR. De ser así, la determinación de potenciales sustratos de la gamma secretasa podría dar luz a un considerable número de candidatos susceptibles de interacción con TAB2/N-CoR con posibles funciones reguladoras a nivel transcripcional.

Una vez en el núcleo, el complejo E4ICD/TAB2/N-CoR funciona como represor de la ruta de diferenciación a astrocitos. Varios son los posibles efectos asociados con la señalización del E4ICD, tales como la represión del desarrollo astrocítico y procesos de neurodegeneración; lo que sugiere que pueda actuar controlando la expresión de un notable grupo de genes. Ante esta hipótesis, planteamos la posible existencia de otros factores que participasen como co-reguladores y/o que confiriesen especificidad en la interacción del E4ICD con las regiones promotoras diana. Apoyando esta posibilidad, nuestros resultados revelan que PARP1, una proteína nuclear implicada en procesos de reparación de daños a nivel de ADN, se asocia al E4ICD. Aun siendo pronto para entender el significado biológico de esta interacción, hemos observado que su unión sucede en NPs tras la activación por NRG1 tal y como habíamos visto para la interacción con TAB2/N-CoR. Sin embargo y a diferencia de este último, la unión de PARP1 fue observada tanto en células 293 transfectadas con LexA-E4ICD wt como en células transfectadas con LexA-E4ICD kd indicando que la autofosforilación (activación) de ErbB4 no es necesaria para la unión de PARP1, aunque no podemos descartar una transfosforilación del

receptor mediante otras proteínas. Para valorar esta posibilidad y estudiar en mayor profundidad la naturaleza de la interacción entre estas proteínas actualmente estamos desarrollando mutantes puntuales independientes en cada una de las 19 tirosinas que el E4ICD posee.

Finalmente, mediante ensayos de luciferasa e inmunoprecipitación de la cromatina hemos determinado que PARP1 es necesario para reprimir la diferenciación astrocítica de los NPs. Dado que PARP1 ha sido previamente descrita como una proteína de unión al ADN y que funciona como co-regulador transcripcional, no sería descabellado posicionar a PARP1 como determinante de especificidad de E4ICD por el promotor *GFAP*. Sin embargo, el hecho de haber detectado PARP1 ligado al promotor de *GFAP* solo cuando las células han sido estimuladas por NRG1 sugiere que el modelo que presentamos sea en realidad más complejo y otros factores sean necesarios para determinar la especificidad del control transcripcional de E4ICD sobre sus genes diana.

Unión del complejo al DNA por el sitio de unión de CSL. ErbB4 y Notch: vías antagonistas.

Hemos observado como la mutación del promotor de *GFAP* en el sitio de unión de la familia de factores de transcripción CSL (CBF1, supresor de Hairless, Lag-1) impide la represión ejercida por NRG1 en la activación del Promotor inducida por CNTF. Así mismo, hemos observado como el factor CBF1, está de manera constitutiva unida al promotor con y sin tratamiento con NRG1. Nuestros resultados sugieren que la vía de Notch y la de ErbB4 podrían entrar en un equilibrio a nivel del promotor de *GFAP* para regular el destino celular. Hemos de recordar que a través de su dominio intracelular (NICD) Notch promueve la transcripción de genes astrocíticos de un modo muy similar a ErbB4. El ligando de Notch, Delta interacciona con el dominio extracelular del receptor liberando su dominio intracelular, NICD. La escisión extracelular es catalizada por TACE, mientras que la escisión intramembrana está mediada por un complejo que contiene miembros de la familia de presenilinas y nicastrinas. El fragmento NICD a continuación, entra en el núcleo donde interactúa con los miembros de la familia de factores de transcripción CSL (CBF1, supresor de Hairless, Lag-1). Esta acción inter-convierte las proteínas CSL de represores transcripcionales en activadores de la transcripción activando genes como por ejemplo los de la familia Hes (29) inhibidores de la neurogénesis y activando la

transcripción de genes gliales mediante la unión del complejo al sitio de unión de CSL del promotor de GFAP. Puede que exista por tanto un *crosstalk* de ambas vías a nivel de CSL y el balance E4ICD NICD determine qué genes van a ser transcritos y cuáles van a ser reprimidos alternando así neurogénesis y astrogénesis como si de un interruptor biológico se tratase.

ErbB4 Y AD

La señalización mediada por ErbB4 regula varios aspectos del desarrollo y la función neuronal más allá de la neurogénesis, incluyendo: morfología dendrítica (87), expresión de receptores de neurotransmisores (80), y supervivencia neuronal (53), los cuales han sido implicados en la patología de AD.

Defectos en la señalización de ErbB4 podrían estar implicados en la aparición de AD ya que la expresión de GFAP y de S100b se incrementan en AD (72). Por lo tanto, defectos en la señalización dependiente de presenilina de ErbB4 podría dar lugar a una mayor expresión de genes astrocíticos, que a su vez podría contribuir a la enfermedad de AD al potenciar el proceso degenerativo iniciado por β -amiloide. Por último, una intrigante posibilidad es que la señalización nuclear de ErbB4 también podría regular la diferenciación de los precursores neuronales de adultos y que defectos en esta vía podrían dar lugar a alteraciones en la neurogénesis adulta, lo que contribuiría a AD (24).

En resumen, este estudio revela un mecanismo de señalización de un RTK, y proporciona información sobre los mecanismos que controlan la astrogénesis en el cerebro en desarrollo. Nuestros hallazgos sobre la señalización nuclear de ErbB4 pueden ser relevantes para otros RTK en los que la unión del ligando provoque la liberación del dominio extracelular como el de ErbB4.

CONCLUSIONES

De la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral se han deducido las siguientes conclusiones:

- 1- Los NPs, gracias a su multipotencia, son una herramienta excelente para el estudio del destino celular.
- 2- En estos cultivos hemos podido comprobar que El receptor ErbB4 tras unirse a su ligando NRG1, se autofosforila y sufre un corte proteolítico liberando su dominio intracelular , denominado E4ICD , que se une a las proteínas Tab2- N-CoR
- 3- El dominio intracelular del receptor de ErbB4 interacciona con PARP1 y con Kif23 en células HEK y en NPs.
- 4- Kif23 se expresa en precursores neuronales y en neuronas.
- 5- El complejo formado por el E4ICD transloca al núcleo donde interacciona con la proteína nuclear PARP1 siendo parte del sistema de represión del gen glial *GFAP*.
- 6- La represión transcripcional se realiza a través del dominio CSL del promotor de *GFAP* y E4ICD podría reclutar PARP1, y unirse a CBF1 como parte del sistema de represión.

REFERENCIAS

1. **Angevine, J. B., Jr., and R. L. Sidman.** 1961. Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* **192**:766-8.
2. **Anton, E. S., H. T. Ghashghaei, J. L. Weber, C. McCann, T. M. Fischer, I. D. Cheung, M. Gassmann, A. Messing, R. Klein, M. H. Schwab, K. C. Lloyd, and C. Lai.** 2004. Receptor tyrosine kinase ErbB4 modulates neuroblast migration and placement in the adult forebrain. *Nat Neurosci* **7**:1319-28.
3. **Anton, E. S., M. A. Marchionni, K. F. Lee, and P. Rakic.** 1997. Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. *Development* **124**:3501-10.
4. **Araque, A., and M. Navarrete.** 2010. Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**:2375-81.
5. **Ayala, R., T. Shu, and L. H. Tsai.** 2007. Trekking across the brain: the journey of neuronal migration. *Cell* **128**:29-43.
6. **Birchmeier, C.** 2009. ErbB receptors and the development of the nervous system. *Exp Cell Res* **315**:611-8.
7. **Bonni, A., Y. Sun, M. Nadal-Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos, and M. E. Greenberg.** 1997. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**:477-83.
8. **Brockes, J. P., M. C. Raff, D. J. Nishiguchi, and J. Winter.** 1980. Studies on cultured rat Schwann cells. III. Assays for peripheral myelin proteins. *J Neurocytol* **9**:67-77.
9. **Buonanno, A., and G. D. Fischbach.** 2001. Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **11**:287-96.
10. **Carpenter, G.** 2003. ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* **284**:66-77.
11. **Castro, D. S., D. Skowronska-Krawczyk, O. Armant, I. J. Donaldson, C. Parras, C. Hunt, J. A. Critchley, L. Nguyen, A. Gossler, B. Gottgens, J. M. Matter, and F. Guillemot.** 2006. Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev Cell* **11**:831-44.
12. **Caviness, V. S., Jr., and T. Takahashi.** 1995. Proliferative events in the cerebral ventricular zone. *Brain Dev* **17**:159-63.
13. **Chambers, C. B., Y. Peng, H. Nguyen, N. Gaiano, G. Fishell, and J. S. Nye.** 2001. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* **128**:689-702.
14. **Chaudhury, A. R., K. M. Gerecke, J. M. Wyss, D. G. Morgan, M. N. Gordon, and S. L. Carroll.** 2003. Neuregulin-1 and erbB4 immunoreactivity is associated with neuritic plaques in Alzheimer disease brain and in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**:42-54.
15. **Chenn, A., and C. A. Walsh.** 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* **297**:365-9.
16. **Corfas, G., K. M. Rosen, H. Aratake, R. Krauss, and G. D. Fischbach.** 1995. Differential expression of ARIA isoforms in the rat brain. *Neuron* **14**:103-15.

17. **Deneen, B., R. Ho, A. Lukaszewicz, C. J. Hochstim, R. M. Gronostajski, and D. J. Anderson.** 2006. The transcription factor NFIA controls the onset of gliogenesis in the developing spinal cord. *Neuron* **52**:953-68.
18. **Downward, J., Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M. D. Waterfield.** 1984. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**:521-7.
19. **Elenius, K., C. J. Choi, S. Paul, E. Santiestevan, E. Nishi, and M. Klagsbrun.** 1999. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* **18**:2607-15.
20. **Elenius, K., G. Corfas, S. Paul, C. J. Choi, C. Rio, G. D. Plowman, and M. Klagsbrun.** 1997. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem* **272**:26761-8.
21. **Falls, D. L.** 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* **284**:14-30.
22. **Falls, D. L., K. M. Rosen, G. Corfas, W. S. Lane, and G. D. Fischbach.** 1993. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**:801-15.
23. **Farkas, L. M., and W. B. Huttner.** 2008. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* **20**:707-15.
24. **Feng, R., C. Rampon, Y. P. Tang, D. Shrom, J. Jin, M. Kyin, B. Sopher, M. W. Miller, C. B. Ware, G. M. Martin, S. H. Kim, R. B. Langdon, S. S. Sisodia, and J. Z. Tsien.** 2001. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* **32**:911-26.
25. **Flames, N., J. E. Long, A. N. Garratt, T. M. Fischer, M. Gassmann, C. Birchmeier, C. Lai, J. L. Rubenstein, and O. Marin.** 2004. Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1. *Neuron* **44**:251-61.
26. **Fox, I. J., and H. I. Kornblum.** 2005. Developmental profile of ErbB receptors in murine central nervous system: implications for functional interactions. *J Neurosci Res* **79**:584-97.
27. **Francis, A., T. D. Raabe, D. Wen, and G. H. DeVries.** 1999. Neuregulins and ErbB receptors in cultured neonatal astrocytes. *J Neurosci Res* **57**:487-94.
28. **Gassmann, M., F. Casagrande, D. Orioli, H. Simon, C. Lai, R. Klein, and G. Lemke.** 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* **378**:390-4.
29. **Ge, W., K. Martinowich, X. Wu, F. He, A. Miyamoto, G. Fan, G. Weinmaster, and Y. E. Sun.** 2002. Notch signaling promotes astroglial gene activation via direct CSL-mediated glial gene activation. *J Neurosci Res* **69**:848-60.
30. **Gerecke, K. M., J. M. Wyss, I. Karavanova, A. Buonanno, and S. L. Carroll.** 2001. ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are differentially expressed throughout the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* **433**:86-100.
31. **Goodearl, A. D., J. B. Davis, K. Mistry, L. Minghetti, M. Otsu, M. D. Waterfield, and P. Stroobant.** 1993. Purification of multiple forms of glial growth factor. *J Biol Chem* **268**:18095-102.

32. **Grandbarbe, L., J. Bouissac, M. Rand, M. Hrabe de Angelis, S. Artavanis-Tsakonas, and E. Mohier.** 2003. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* **130**:1391-402.
33. **Gross, R. E., M. F. Mehler, P. C. Mabie, Z. Zang, L. Santschi, and J. A. Kessler.** 1996. Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**:595-606.
34. **Guy, P. M., J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione, and K. L. Carraway, 3rd.** 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:8132-6.
35. **Hatten, M. E.** 2002. New directions in neuronal migration. *Science* **297**:1660-3.
36. **Haubensak, W., A. Attardo, W. Denk, and W. B. Huttner.** 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3196-201.
37. **He, F., W. Ge, K. Martinowich, S. Becker-Catania, V. Coskun, W. Zhu, H. Wu, D. Castro, F. Guillemot, G. Fan, J. de Vellis, and Y. E. Sun.** 2005. A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astroglialogenesis. *Nat Neurosci* **8**:616-25.
38. **Heldin, C. H.** 1991. SH2 domains: elements that control protein interactions during signal transduction. *Trends Biochem Sci* **16**:450-2.
39. **Hirabayashi, Y., Y. Itoh, H. Tabata, K. Nakajima, T. Akiyama, N. Masuyama, and Y. Gotoh.** 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* **131**:2791-801.
40. **Holmes, W. E., M. X. Sliwkowski, R. W. Akita, W. J. Henzel, J. Lee, J. W. Park, D. Yansura, N. Abadi, H. Raab, G. D. Lewis, and et al.** 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* **256**:1205-10.
41. **Hubbard, S. R., M. Mohammadi, and J. Schlessinger.** 1998. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* **273**:11987-90.
42. **Hunter, T.** 1998. The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**:583-605.
43. **Hutton, M., and J. Hardy.** 1997. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **6**:1639-46.
44. **Hynes, N. E., and H. A. Lane.** 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**:341-54.
45. **Kageyama, R., T. Ohtsuka, H. Shimojo, and I. Imayoshi.** 2008. Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nat Neurosci* **11**:1247-51.
46. **Kamakura, S., K. Oishi, T. Yoshimatsu, M. Nakafuku, N. Masuyama, and Y. Gotoh.** 2004. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* **6**:547-54.
47. **Kang, W., L. C. Wong, S. H. Shi, and J. M. Hebert.** 2009. The transition from radial glial to intermediate progenitor cell is inhibited by FGF signaling during corticogenesis. *J Neurosci* **29**:14571-80.
48. **Klausberger, T., and P. Somogyi.** 2008. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**:53-7.

49. **Koch, C. A., D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis, and T. Pawson.** 1991. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* **252**:668-74.
50. **Kriegstein, A., and A. Alvarez-Buylla.** 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**:149-84.
51. **Kuwahara, A., Y. Hirabayashi, P. S. Knoepfler, M. M. Taketo, J. Sakai, T. Kodama, and Y. Gotoh.** 2010. Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development* **137**:1035-44.
52. **Law, A. J., B. K. Lipska, C. S. Weickert, T. M. Hyde, R. E. Straub, R. Hashimoto, P. J. Harrison, J. E. Kleinman, and D. R. Weinberger.** 2006. Neuregulin 1 transcripts are differentially expressed in schizophrenia and regulated by 5' SNPs associated with the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6747-52.
53. **Li, B. S., W. Ma, H. Jaffe, Y. Zheng, S. Takahashi, L. Zhang, A. B. Kulkarni, and H. C. Pant.** 2003. Cyclin-dependent kinase-5 is involved in neuregulin-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activity mediating neuronal survival. *J Biol Chem* **278**:35702-9.
54. **Li, W., C. A. Cogswell, and J. J. LoTurco.** 1998. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci* **18**:8853-62.
55. **Lopez-Bendito, G., A. Cautinat, J. A. Sanchez, F. Bielle, N. Flames, A. N. Garratt, D. A. Talmage, L. W. Role, P. Charnay, O. Marin, and S. Garel.** 2006. Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation. *Cell* **125**:127-42.
56. **Lukaszewicz, A., P. Savatier, V. Cortay, P. Giroud, C. Huissoud, M. Berland, H. Kennedy, and C. Dehay.** 2005. G1 phase regulation, area-specific cell cycle control, and cytoarchitectonics in the primate cortex. *Neuron* **47**:353-64.
57. **Mabie, P. C., M. F. Mehler, and J. A. Kessler.** 1999. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype. *J Neurosci* **19**:7077-88.
58. **Machon, O., C. J. van den Bout, M. Backman, R. Kemler, and S. Krauss.** 2003. Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* **122**:129-43.
59. **Mairet-Coello, G., A. Tury, and E. DiCicco-Bloom.** 2009. Insulin-like growth factor-1 promotes G(1)/S cell cycle progression through bidirectional regulation of cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in developing rat cerebral cortex. *J Neurosci* **29**:775-88.
60. **Maliga, Z., M. Junqueira, Y. Toyoda, A. Ettinger, F. Mora-Bermudez, R. W. Klemm, A. Vasilj, E. Guhr, I. Ibarlucea-Benitez, I. Poser, E. Bonifacio, W. B. Huttner, A. Shevchenko, and A. A. Hyman.** 2013. A genomic toolkit to investigate kinesin and myosin motor function in cells. *Nat Cell Biol* **15**:325-34.
61. **Marchionni, M. A., A. D. Goodearl, M. S. Chen, O. Bermingham-McDonogh, C. Kirk, M. Hendricks, F. Danehy, D. Misumi, J. Sudhalter, K. Kobayashi, and et al.** 1993. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**:312-8.
62. **Margolis, B.** 1992. Proteins with SH2 domains: transducers in the tyrosine kinase signaling pathway. *Cell Growth Differ* **3**:73-80.

63. **Marin, O., and J. L. Rubenstein.** 2003. Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* **26**:441-83.
64. **Martynoga, B., D. Drechsel, and F. Guillemot.** 2012. Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**.
65. **Masland, R. H.** 2004. Neuronal cell types. *Curr Biol* **14**:R497-500.
66. **Mason, H. A., S. Ito, and G. Corfas.** 2001. Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* **21**:7654-63.
67. **Mei, L., and W. C. Xiong.** 2008. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **9**:437-52.
68. **Meyer, D., and C. Birchmeier.** 1994. Distinct isoforms of neuregulin are expressed in mesenchymal and neuronal cells during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:1064-8.
69. **Mishima, M., V. Pavicic, U. Gruneberg, E. A. Nigg, and M. Glotzer.** 2004. Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature* **430**:908-13.
70. **Miyata, T., A. Kawaguchi, K. Saito, M. Kawano, T. Muto, and M. Ogawa.** 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* **131**:3133-45.
71. **Mott, D. D., and R. Dingledine.** 2003. Interneuron Diversity series: Interneuron research--challenges and strategies. *Trends Neurosci* **26**:484-8.
72. **Mrak, R. E., and W. S. Griffin.** 2001. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **22**:903-8.
73. **Munji, R. N., Y. Choe, G. Li, J. A. Siegenthaler, and S. J. Pleasure.** 2011. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci* **31**:1676-87.
74. **Nakashima, K., T. Takizawa, W. Ochiai, M. Yanagisawa, T. Hisatsune, M. Nakafuku, K. Miyazono, T. Kishimoto, R. Kageyama, and T. Taga.** 2001. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5868-73.
75. **Nakashima, K., M. Yanagisawa, H. Arakawa, N. Kimura, T. Hisatsune, M. Kawabata, K. Miyazono, and T. Taga.** 1999. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* **284**:479-82.
76. **Namihira, M., J. Kohyama, K. Semi, T. Sanosaka, B. Deneen, T. Taga, and K. Nakashima.** 2009. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* **16**:245-55.
77. **Ni, C. Y., M. P. Murphy, T. E. Golde, and G. Carpenter.** 2001. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* **294**:2179-81.
78. **Nishimura, Y., and S. Yonemura.** 2006. Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci* **119**:104-14.
79. **Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, and A. R. Kriegstein.** 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7**:136-44.
80. **Okada, M., and G. Corfas.** 2004. Neuregulin1 downregulates postsynaptic GABAA receptors at the hippocampal inhibitory synapse. *Hippocampus* **14**:337-44.

81. **Peles, E., S. S. Bacus, R. A. Koski, H. S. Lu, D. Wen, S. G. Ogden, R. B. Levy, and Y. Yarden.** 1992. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* **69**:205-16.
82. **Plowman, G. D., J. M. Culouscou, G. S. Whitney, J. M. Green, G. W. Carlton, L. Foy, M. G. Neubauer, and M. Shoyab.** 1993. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1746-50.
83. **Raabe, T. D., G. Deadwyler, J. W. Varga, and G. H. Devries.** 2004. Localization of neuregulin isoforms and erbB receptors in myelinating glial cells. *Glia* **45**:197-207.
84. **Raballo, R., J. Rhee, R. Lyn-Cook, J. F. Leckman, M. L. Schwartz, and F. M. Vaccarino.** 2000. Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* **20**:5012-23.
85. **Rakic, P., A. E. Ayoub, J. J. Breunig, and M. H. Dominguez.** 2009. Decision by division: making cortical maps. *Trends Neurosci* **32**:291-301.
86. **Richards, K. N., P. A. Zweidler-McKay, N. Van Roy, F. Speleman, J. Trevino, P. E. Zage, and D. P. Hughes.** 2010. Signaling of ERBB receptor tyrosine kinases promotes neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Cancer* **116**:3233-43.
87. **Rieff, H. I., and G. Corfas.** 2006. ErbB receptor signalling regulates dendrite formation in mouse cerebellar granule cells in vivo. *Eur J Neurosci* **23**:2225-9.
88. **Riese, D. J., 2nd, T. M. van Raaij, G. D. Plowman, G. C. Andrews, and D. F. Stern.** 1995. The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the erbB receptor family. *Mol Cell Biol* **15**:5770-6.
89. **Rio, C., J. D. Buxbaum, J. J. Peschon, and G. Corfas.** 2000. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem* **275**:10379-87.
90. **Rio, C., H. I. Rieff, P. Qi, T. S. Khurana, and G. Corfas.** 1997. Neuregulin and erbB receptors play a critical role in neuronal migration. *Neuron* **19**:39-50.
91. **Ritch, P. S., S. L. Carroll, and H. Sontheimer.** 2005. Neuregulin-1 enhances survival of human astrocytic glioma cells. *Glia* **51**:217-28.
92. **Roy, K., J. C. Murtie, B. F. El-Khodori, N. Edgar, S. P. Sardi, B. M. Hooks, M. Benoit-Marand, C. Chen, H. Moore, P. O'Donnell, D. Brunner, and G. Corfas.** 2007. Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:8131-6.
93. **Sardi, S. P., J. Murtie, S. Koirala, B. A. Patten, and G. Corfas.** 2006. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* **127**:185-97.
94. **Saura, C. A., S. Y. Choi, V. Beglopoulos, S. Malkani, D. Zhang, B. S. Shankaranarayana Rao, S. Chattarji, R. J. Kelleher, 3rd, E. R. Kandel, K. Duff, A. Kirkwood, and J. Shen.** 2004. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**:23-36.
95. **Schlessinger, J.** 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**:211-25.
96. **Schlessinger, J.** 2004. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* **306**:1506-7.

97. **Schlessinger, J.** 1988. Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* **13**:443-7.
98. **Schmid, R. S., B. McGrath, B. E. Berechid, B. Boyles, M. Marchionni, N. Sestan, and E. S. Anton.** 2003. Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:4251-6.
99. **Seuntjens, E., A. Nityanandam, A. Miquelajauregui, J. Debruyne, A. Stryjewska, S. Goebbels, K. A. Nave, D. Huylebroeck, and V. Tarabykin.** 2009. Sip1 regulates sequential fate decisions by feedback signaling from postmitotic neurons to progenitors. *Nat Neurosci* **12**:1373-80.
100. **Shah, N. M., M. A. Marchionni, I. Isaacs, P. Stroobant, and D. J. Anderson.** 1994. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. *Cell* **77**:349-60.
101. **Song, M. R., and A. Ghosh.** 2004. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* **7**:229-35.
102. **Stefansson, H., E. Sigurdsson, V. Steinthorsdottir, S. Bjornsdottir, T. Sigmundsson, S. Ghosh, J. Brynjolfsson, S. Gunnarsdottir, O. Ivarsson, T. T. Chou, O. Hjaltason, B. Birgisdottir, H. Jonsson, V. G. Gudnadottir, E. Gudmundsdottir, A. Bjornsson, B. Ingvarsson, A. Ingason, S. Sigfusson, H. Hardardottir, R. P. Harvey, D. Lai, M. Zhou, D. Brunner, V. Mutel, A. Gonzalo, G. Lemke, J. Sainz, G. Johannesson, T. Andreasson, D. Gudbjartsson, A. Manolescu, M. L. Frigge, M. E. Gurney, A. Kong, J. R. Gulcher, H. Petursson, and K. Stefansson.** 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* **71**:877-92.
103. **Steinthorsdottir, V., H. Stefansson, S. Ghosh, B. Birgisdottir, S. Bjornsdottir, A. C. Fasquel, O. Olafsson, K. Stefansson, and J. R. Gulcher.** 2004. Multiple novel transcription initiation sites for NRG1. *Gene* **342**:97-105.
104. **Sussman, C. R., T. Vartanian, and R. H. Miller.** 2005. The ErbB4 neuregulin receptor mediates suppression of oligodendrocyte maturation. *J Neurosci* **25**:5757-62.
105. **Takahashi, S., N. Fusaki, S. Ohta, Y. Iwahori, Y. Iizuka, K. Inagawa, Y. Kawakami, K. Yoshida, and M. Toda.** 2012. Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *J Neurooncol* **106**:519-29.
106. **Takahashi, T., T. Goto, S. Miyama, R. S. Nowakowski, and V. S. Caviness, Jr.** 1999. Sequence of neuron origin and neocortical laminar fate: relation to cell cycle of origin in the developing murine cerebral wall. *J Neurosci* **19**:10357-71.
107. **Tarui, T., T. Takahashi, R. S. Nowakowski, N. L. Hayes, P. G. Bhide, and V. S. Caviness.** 2005. Overexpression of p27 Kip 1, probability of cell cycle exit, and laminar destination of neocortical neurons. *Cereb Cortex* **15**:1343-55.
108. **Taveggia, C., P. Thaker, A. Petrylak, G. L. Caporaso, A. Toews, D. L. Falls, S. Einheber, and J. L. Salzer.** 2008. Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* **56**:284-93.
109. **Thivierge, J. P.** 2008. Neural diversity creates a rich repertoire of brain activity. *Commun Integr Biol* **1**:188-9.
110. **Ullrich, A., and J. Schlessinger.** 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**:203-12.

111. **Vartanian, T., G. Fischbach, and R. Miller.** 1999. Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:731-5.
112. **Vartanian, T., A. Goodearl, A. Viehover, and G. Fischbach.** 1997. Axonal neuregulin signals cells of the oligodendrocyte lineage through activation of HER4 and Schwann cells through HER2 and HER3. *J Cell Biol* **137**:211-20.
113. **Vennstrom, B., D. Sheiness, J. Zabielski, and J. M. Bishop.** 1982. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* **42**:773-9.
114. **Vidal, G. A., A. Naresh, L. Marrero, and F. E. Jones.** 2005. Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J Biol Chem* **280**:19777-83.
115. **Viti, J., A. Gulacsi, and L. Lillien.** 2003. Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *J Neurosci* **23**:5919-27.
116. **Wang, S. M., L. L. Ooi, and K. M. Hui.** 2011. Upregulation of Rac GTPase-activating protein 1 is significantly associated with the early recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **17**:6040-51.
117. **Wen, D., E. Peles, R. Cupples, S. V. Suggs, S. S. Bacus, Y. Luo, G. Trail, S. Hu, S. M. Silbiger, R. B. Levy, and et al.** 1992. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69**:559-72.
118. **Woodhead, G. J., C. A. Mutch, E. C. Olson, and A. Chenn.** 2006. Cell-autonomous beta-catenin signaling regulates cortical precursor proliferation. *J Neurosci* **26**:12620-30.
119. **Yarden, Y., and M. X. Sliwkowski.** 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:127-37.
120. **Yoon, K., S. Nery, M. L. Rutlin, F. Radtke, G. Fishell, and N. Gaiano.** 2004. Fibroblast growth factor receptor signaling promotes radial glial identity and interacts with Notch1 signaling in telencephalic progenitors. *J Neurosci* **24**:9497-506.
121. **Yu, W., D. J. Sharp, R. Kuriyama, P. Mallik, and P. W. Baas.** 1997. Inhibition of a mitotic motor compromises the formation of dendrite-like processes from neuroblastoma cells. *J Cell Biol* **136**:659-68.
122. **Zhou, C. J., U. Borello, J. L. Rubenstein, and S. J. Pleasure.** 2006. Neuronal production and precursor proliferation defects in the neocortex of mice with loss of function in the canonical Wnt signaling pathway. *Neuroscience* **142**:1119-31.